

Mikromorphologische
Untersuchungen zu zellstadienspezifischen
und chloramphenicolinduzierten Veränderungen am
Chondriom von Chlamydomonas reinhardtii

von
Rudolf Blank
aus
Amberg

1980

1980 # 453



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Mikromorphologische
Untersuchungen zu zellstadienspezifischen
und chloramphenicolinduzierten Veränderungen am
Chondriom von Chlamydomonas reinhardtii

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur

Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt
von
Rudolf Blank
aus
Amberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung:

22. Okt. 1980

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. C. G. Arnold

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. H. Korn

	Seite
I. Einführung.....	1
1. Die Morphologie der Mitochondrien.....	1
a) Allgemeines.....	1
b) Die Mitochondrien von Chlamydomonas reinhardtii.....	3
2. Die Beeinflussung der Mitochondrienstruktur.....	6
a) Chloramphenicol als Proteinsynthesehemmer.....	6
b) Die Morphologie pathologisch veränderter Mitochondrien.....	8
II. Material und Methoden.....	11
1. Versuchsstamm und Kulturbedingungen.....	11
a) Algenstamm.....	11
b) Kulturmedien.....	11
c) Synchronisierung des vegetativen Zellzyklus.....	13
d) Gameteninduktion in Dunkelheit und Kälte.....	16
2. Präparationstechniken, Morphometrie und Rekonstruktion.....	17
a) Fixierung und Einbettung.....	17
b) Ultradünnschnittserientechnik und Elektronenmikroskopie.....	20
c) Graphische dreidimensionale Rekonstruktion und Morphometrie.....	23
d) Modellbau.....	24
III. Vorversuche.....	26
1. Versuche zur Synchronisierung und Gametogenese in Dunkelheit und Kälte.....	26
a) Optimierung der Kulturbedingungen zur Synchronisierung.....	26
b) Dunkel-Kälte-Induktion.....	29
2. Versuche mit Chloramphenicol.....	31
a) Wachstumsraten in Gegenwart von Chloramphenicol zur Ermittlung sensitiver Stadien im Zellzyklus.....	31
b) Dunkel-Kälte-Induktion in Gegenwart von Chloramphenicol.....	38

IV. Ergebnisse.....	41
1. Die Morphologie der Mitochondrien in verschiedenen Stadien des Zellzyklus.....	41
a) Vegetatives Stadium $t = 0$ (Zellen bei Lichtbeginn).....	41
b) Vegetatives Stadium $t = 6$ (Zellen der 6. Lichtstunde).....	45
c) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 9 + 20$ h (20stündige Induktion von Zellen der 9. Lichtstunde).....	48
d) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 0 + 20$ h (20stündige Induktion von Zellen bei Lichtbeginn).....	56
2. Die Morphologie der Mitochondrien in Gegenwart von Chloramphenicol.....	61
a) Vegetatives Stadium $t = 0 + 6$ h CAP (6stündige Behandlung von Zellen bei Lichtbeginn).....	61
b) Vegetatives Stadium $t = 0 + 12$ h CAP (12stündige Behandlung von Zellen bei Lichtbeginn).....	68
c) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 9 + 20$ h CAP (20stündige Behandlung während der Induktion von Zellen der 9. Lichtstunde).....	73
d) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 0 + 20$ h CAP (20stündige Behandlung während der Induktion von Zellen bei Lichtbeginn).....	76
V. Diskussion.....	83
1. Der Mitochondrienbestand im Verlauf des Zellzyklus.....	83
a) Der mitochondrielle Subzyklus.....	83
b) Größen der Mitochondrien.....	89
2. Der Mitochondrienbestand nach Chloramphenicolbehandlung.....	94
a) Morphologie und Morphometrie pathologisch veränderter Mitochondrien.....	94
b) Die dreidimensionale Struktur von Megamitochondrien.....	104
VI. Zusammenfassung.....	110
VII. Literaturverzeichnis.....	113

I. EINFÜHRUNG

1. DIE MORPHOLOGIE DER MITOCHONDRIEN

a) Allgemeines

Im Rahmen lichtmikroskopischer Untersuchungen zu nichtmen-
delnden Vererbungsphänomenen fanden die Mitochondrien be-
reits zu Beginn des 20. Jahrhunderts das Interesse cytol-
ogischer Forschungen (MEVES, 1908, 1913), doch erleichterten
erst spätere phasenkontrastmikroskopische Studien den Nach-
weis eines ausgeprägten mitochondriellen Formenwechsels
(ZOLLINGER, 1948; CHEVREMONT, 1953; FRÉDÉRIC, 1958). Kine-
matographische Aufnahmen an lebenden Zellen ermöglichten
schließlich die genaue und wiederholbare Analyse der Morpho-
dynamik und die Messung der Geschwindigkeit von Mitochon-
drienbewegungen (BEREITER-HAHN, 1978, bestimmte sie für das
Xenopus-Kaulquappenherz auf bis zu 6 mm/h).

Elektronenmikroskopische Feinstrukturuntersuchungen be-
schränkten sich dagegen zunächst auf die Beschreibung mito-
chondrieller Formen in einzelnen Zellanschnitten; der Über-
blick über die Gesamtorganisation des in einer Zelle vor-
liegenden Chondrioms und seine Morphodynamik ging dadurch
verloren. Erst die Anwendung der aufwendigen und sehr zeit-
raubenden Methode der Serienschrittechnik mit nachfolgender
dreidimensionaler Rekonstruktion anhand lückenloser Ultra-
dünnschnittserien erlaubte es, die Mitochondrienzahl und
die sterische Anordnung des gesamten Organellenkomplexes in
einer Zelle auch elektronenoptisch zu analysieren (vergl.
ARNOLD und GAFFAL, 1979a; TAYLOR und WELLS, 1979). Morpho-
metrische Auswertungen und verschiedentlich zur Arbeitser-
leichterung eingesetzte Computertechnologien schlossen sich
an (z. B. STEVENS, 1977; STEVENS und WHITE, 1979). Bei der

vergleichenden Untersuchung unterschiedlicher Zellstadien mit Hilfe dieser Methode kommt das morphodynamische Verhalten der Mitochondrien wie bei einer Aneinanderreihung stehender Bilder schließlich wieder zum Vorschein.

Untersuchungen zur Veränderung der zwei- oder dreidimensionalen Struktur der Mitochondrien in unterschiedlichen zellulären Entwicklungsstadien von Einzellern, aber auch von pflanzlichen und tierischen Geweben sind heute Allgemeingut der cytologischen Grundlagenforschung und wurden schon häufig beschrieben. So kommt es in Kalluskulturen von Gingko in Abhängigkeit von der Kulturdauer zu mitochondriellen Umbaureaktionen (ROHR, 1978, 1979) ebenso wie in Rattenhepatocyten während der postnatalen Entwicklung (DAVID, 1979); für das Rattenephron werden zwei Arten von Mitochondrienpopulationen angenommen (BERGERON et al., 1980), und die Mitochondrien des menschlichen Endometriums zeigen während des Menstruationszyklus Variationen in Größe, Zahl und Komplexität der Strukturen (WORTH und LUCAS, 1978). Mitochondrienveränderungen in Abhängigkeit von den Zellzyklusbedingungen sind für verschiedene Pilze ebenso bekannt wie für Ciliaten und Flagellaten (Blastocladiella: BROMBERG, 1974 - Phycomyces: PAMBOR, 1979 - Physarum: KUROIWA et al., 1978; KUROIWA und TAKAHASHI, 1978, 1980 - Saccharomyces: YOTSUYANAGI, 1955; COTTRELL und AVERS, 1970; STEVENS, 1977 - Trichoderma: ROSEN et al., 1974 - Tetrahymena: ELLIOTT und BAK, 1964; KOLB-BACHOFEN und VOGELL, 1975 - Bodo: BRUGEROLLE und MIGNOT, 1979 - Chlamydomonas: OSAFUNE et al., 1972a, 1972b; GROBE und ARNOLD, 1975; OSAFUNE et al., 1975c; GROBE, 1976; OSAFUNE et al., 1976; GROBE und ARNOLD, 1977 - Chlorella: ATKINSON et al., 1974 - Euglena: CALVAYRAC et al., 1972; LEDOIGHT et al., 1972; OSAFUNE, 1973; CALVAYRAC et al., 1974; LEFORT-TRAN, 1975; OSAFUNE et al., 1975a, 1975b, 1975d; PELLEGRINI und PELLEGRINI, 1976 - Polytoma: GAFFAL und KREUTZER, 1977; GAFFAL und SCHNEIDER, 1978).

b) Die Mitochondrien von Chlamydomonas reinhardtii

Die Mitochondrien nehmen in einer Zelle des Phytoflagellaten *Chlamydomonas reinhardtii*, die je nach Entwicklungsstadium ellipsoidisch bis kugelig und etwa 7 bis 15 μm lang bzw. 4 bis 15 μm breit ist (vergl. LEVINE und EBERSOLD, 1960; ETTL, 1976), nur geringen Raum ein. Vielmehr besetzt bereits in einer jungen Interphasezelle der Chloroplast einen großen Teil der Gesamtzelle, während der Kern - anders als für kreuzungsbereite Gameten diskutiert (BLANK et al., 1978) - in der Höhlung der becherförmigen Plastide liegt. Die Mitochondrien befinden sich in diesem Stadium überwiegend im peripheren Zellbereich zwischen äußerer Chloroplastenmembran und Plasmalemma bzw. im apikalen Teil der Zelle in der Nähe der Geißelbasis, können aber auch durch Chloroplastenperforationen in das Innere der Zelle ziehen (Abb. 1, 2).

Aufgrund lichtmikroskopischer Untersuchungen an *Chlamydomonas*-Zellen beschrieb HOLLANDE (1942) lange, sinusartige Elemente, die zu einem den Chloroplasten umfassenden Mitochondriennetz fusioniert sein sollen; ETTL (1970) identifizierte dagegen zwei Gruppen von Mitochondrien, die einen in der Plastidenhöhlung im Zellzentrum, die anderen an der äußeren Chloroplastenoberfläche. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an aus Asynchronkulturen gewonnenen Gameten von *Chlamydomonas reinhardtii* anhand von Serienschnitten (ARNOLD et al., 1972; SCHÖTZ, 1972; SCHÖTZ et al., 1972) kamen im wesentlichen zu der gleichen dreidimensionalen Darstellung wie in Abb. 2. Im Gegensatz dazu analysierten OSAFUNE et al. (1972a, 1972b, 1975c, 1976) den Mitochondrienbestand in einigen Zellstadien während des synchronisierten vegetativen Lebenszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii*. Das hierbei gefundene morphodynamische Verhalten, das sich in einer Fusion vieler Einzelmitochondrien zu hoch verzweigten Riesenmitochondrien und deren späterem Zerfall in wieder

kleinere Einheiten offenbart, wurde für Gameten bzw. Zygotten bestätigt (GROBE und ARNOLD, 1975; GROBE, 1976; GROBE und ARNOLD, 1977).



Abb. 1: *Chlamydomonas reinhardtii*: Die schematische Darstellung basiert auf einer Reihe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen durch mehrere junge Interphaszellen und zeigt den Bauplan des grünen Flagellaten mit Geißel (G), Kontraktiler Vakuole (KV), Kern (K), Chloroplast (Cp), Mitochondrien (M), Golgi-Apparat (GA), Endoplasmatischem Retikulum (ER), cytoplasmatischen Ribosomen (R) und plastidären bzw. mitochondriellen Ribosomen (r)



Abb. 2: Modell des Chloroplasten, der Mitochondrien und des Kerns in einer jungen Interphasezelle von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Rekonstruktion aus 60 Serienschnitten durch die gesamte Zelle: Entsprechend ihrer Anordnung im lebenden Organismus liegen 11 Mitochondrien unterschiedlicher Form überwiegend außerhalb des Chloroplastenbeckers; die Lage des Kerns im Zentrum des Beckers ist durch Pfeile markiert (abgebildet sind von links oben nach rechts unten die Ansichten von vier Seiten, von apikal und von basal)

Obwohl für *Chlamydomonas* Mitochondrien-DNA nachgewiesen wurde (RYAN et al., 1973, 1978), sind an diesem Objekt bisher nur wenige Untersuchungen zur Mitochondriengenetik durchgeführt worden. Da das morphologische Verhalten des Chondrioms auch für Fragen der extrakaryotischen Vererbung von Bedeutung ist, schien es von Interesse, weitere Untersuchungen zum Mitochondrienbestand in verschiedenen Zellstadien von *Chlamydomonas reinhardtii* durchzuführen und durch morphometrische Auswertungen zu ergänzen.

2. DIE BEEINFLUSSUNG DER MITOCHONDRIENSTRUKTUR

a) Chloramphenicol als Proteinsynthesehemmer

Die Struktur der Mitochondrien ist andererseits auch durch verschiedene Agenzien experimentell beeinflussbar. Als mögliche Substanzen gelten beispielsweise alle Antibiotika, die wie das nachfolgend beschriebene Chloramphenicol in die bakterielle Proteinbiosynthese eingreifen.

Chloramphenicol (CAP), ein Stoffwechselprodukt von *Streptomyces venezuelae*, wird heute ausschließlich durch chemische Synthese erhalten (Molekülmasse: 323,1 u; Summenformel: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$; Strukturformel: s. Abb. 3). Es besitzt zwei asymmetrische Kohlenstoffatome und daher vier Stereoisomere, von denen nur das D(-)-threo-2-Dichloracetamido-1-(4-nitrophenyl)-propan-1,3-diol aufgrund seiner Anlagerung an die große 50-S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und Unterdrückung der Peptidbindungsbildung antibiotische Aktivität zeigt (vergl. WEISBLUM und DAVIES, 1968; PIFFARETTI und FROMENT, 1978). Möglicherweise kommt es auch zu einer Wechselwirkung mit der kleinen 30-S-Untereinheit der 70-S-Ribosomen (GRANT et al., 1979).

Bei der innerlichen Behandlung mikrobieller Infekte in der Humanmedizin ist CAP nur noch selten das Mittel der Wahl, wird aber in bestimmten Fällen nach wie vor angewandt (FINK und GUMP, 1978; IPPEN, 1978). Als toxische Seiteneffekte werden im wesentlichen Schädigungen des Knochenmarks genannt, die zu schweren Blutveränderungen führen können (SUHRLAND und WEISBERGER, 1963; YUNIS und BLOOMBERG, 1964; KROON und DE VRIES, 1969; MARTELO et al., 1969; WATSON und MIDDLETON, 1978; NIJHOF und WIERENGA, 1979; WATSON, 1980).

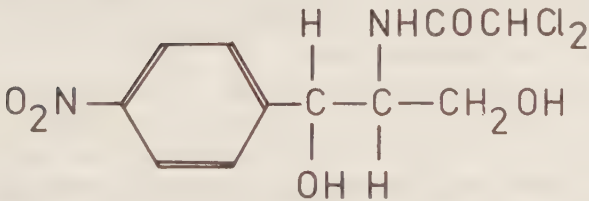


Abb. 3: Strukturformel von Chloramphenicol (CAP)

Eine eindeutige Begründung dafür steht noch aus, doch erscheint es denkbar, daß sie in der Inhibierung der mitochondrialen Proteinbiosynthese liegen könnte (FREEMAN, 1970b; LEHNINGER, 1977). Über die Beziehung zwischen Endosymbiontenhypothese und der Empfindlichkeit der bakterienähnlichen Ribosomen der Mitochondrien gegen Antibiotika mit Angriffspunkten an den 70-S-Ribosomen wurde bereits früher diskutiert (vergl. SAGAN, 1967; WEISBLUM und DAVIES, 1968;

KROON und DE VRIES, 1970; ARNOLD, 1977); tatsächlich zeigt CAP einen ähnlichen Effekt bei Mitochondrien und endosymbiontischen Bakterien desselben Organismus (JEON und HAH, 1977).

In der Forschung wird CAP überwiegend in molekularbiologischen Untersuchungen als spezifischer Inhibitor der mitochondrialen und plastidären Proteinbiosynthese eingesetzt, wobei ihm im wesentlichen derselbe Wirkungsmechanismus wie bei der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese zugeschrieben wird (z. B. AGAM und DJALDETTI, 1977; VÁZQUEZ, 1979). Allerdings kann es bei bestimmten Konzentrationen offenbar zu einer Beeinflussung der kern-codierten Proteinsynthese kommen (MALEC et al., 1964; ANDERSON et al., 1979; GOH, 1979), auch Veränderungen in der Ionenabsorptionskapazität wurden beobachtet (ELLIS, 1963; MACDONALD et al., 1966; WARA-ASWAPATI und BRADBEER, 1974).

b) Die Morphologie pathologisch veränderter Mitochondrien

Verfolgt man die Literaturangaben über Mitochondrienvergrößerungen bis hin zur Ausbildung von Megamitochondrien mit großflächigen Anschnitten, so werden sie verschiedentlich bei Erkrankungen gefunden (z. B. THOENES, 1966; GHADIALLY und SKINNIDER, 1974; KRAUS und CAIN, 1975, 1980), oft als Folge von Überdosierung oder Mangel an Arsen, Blei, Eisen oder Kupfer, z. B. nach Zugabe des Kupferchelators Cuprizon, erwähnt (SUZUKI, 1969; DALLMAN und GOODMAN, 1970; DAVISON et al., 1972; ALBRING et al., 1973a, 1973b, 1973c; KEYHANI, 1973; DAVISON und GARLAND, 1975; ASANO et al., 1978; WAKABAYASHI et al., 1978; FOWLER und WOODS, 1979; FOWLER et al., 1979; SICKO-GOAD und STOERMER, 1979), treten aber auch nach Behandlung mit Corticoiden auf (KIMBERG et

al., 1968; KIMBERG und LOEB, 1972; BERLINER, 1975). Besonders häufig werden sie nach Behandlung mit Arzneimitteln wie Cytostatika und Antibiotika, gerade auch mit CAP, genannt (BEN-SHAUL und MARKUS, 1969; HILL und ANDERSON, 1969; KELLERMAN et al., 1969; CALVAYRAC und BUETOW, 1971; CALVAYRAC et al., 1971; HOWELL et al., 1971; SOSLAU und NASS, 1971; ADOUTTE et al., 1972; KING et al., 1972; KISLEV et al., 1973; MCGILL et al., 1973; NEUMANN und PARTHIER, 1973; ALBRING et al., 1975; WAGNER und RAFAEL, 1975; GRASSO et al., 1977; BAGGER-SJÖBÄCK und WERSÄLL, 1978; MAZZOCCHI et al., 1978; LUNGER und CLARK, 1979; MIKLES-ROBERTSON et al., 1979; NUSSDORFER et al., 1979; PORTER et al., 1979; ASHOUR et al., 1980). Da diese Untersuchungen aber bisher nur an Einzelschnitten durchgeführt wurden, liegen noch keine dreidimensionalen Rekonstruktionen von vergrößerten Organellen oder Megamitochondrien vor.

Ausgehend von elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Genlokalisierung extrakaryotisch vererbter Merkmale von *Chlamydomonas reinhardtii*, die teilweise an antibiotika-abhängigen Mutanten nachgewiesen werden sollten (BEHN, 1973; BEHN und ARNOLD, 1973, 1974b), wurden auch an diesem Objekt bereits mehrere Antibiotika insbesondere auf die von ihnen verursachten ultrastrukturellen Schädigungen an Mitochondrien und Plastiden getestet (BEHN, 1973; BEHN und ARNOLD, 1974a; BLANK, 1976; ZETTEL und ARNOLD, 1977; ARNOLD et al., 1978; GERCKE, 1979). Das Hauptgewicht bei der Beurteilung von Organellenschädigungen lag bei diesen qualitativen Beschreibungen anhand von Einzelschnitten überwiegend bei der Veränderung der Innenstrukturen, während das dreidimensionale Aussehen kaum gewürdigt werden konnte. Es war daher wünschenswert, in weiteren Untersuchungen diesen Aspekt zu berücksichtigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, nicht nur die Veränderungen der Morphologie der Mitochondrien von Chlamy-

domonas reinhardii in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus zu untersuchen, sondern auch über die Verknüpfung der eben beschriebenen Untersuchungen von Arzneimittelnebenwirkungen mit der Technik der dreidimensionalen Rekonstruktion nach ultradünnen Serienschnitten in Verbindung mit morphometrischen Auswertungen den Einfluß von CAP auf die Mitochondrienmorphologie in bestimmten Zellstadien zu beschreiben, um so neben normaldimensionierten Mitochondrien möglicherweise auch Megamitochondrien mit im zweidimensionalen Bild großflächigen Anschnitten dreidimensional charakterisieren zu können.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. VERSUCHSSTAMM UND KULTURBEDINGUNGEN

a) Algenstamm

Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyta, Volvocales) ist ein typischer Phytoflagellat des Süßwassers. Die Species wird häufig auch unter der Bezeichnung *Chlamydomonas reinhardi* oder *Chlamydomonas reinhardtii* geführt (vergl. ETTL, 1976). Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde der in unserem Labor in Dauerkultur gehaltene Stamm *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT verwendet. Beide Paarungstypen mt(+) und mt(-) wurden kultiviert. Dieser ursprünglich aus dem Labor von LOPPES (Liège) abstammende Wildtyp hat nicht die Möglichkeit, Nitrat als Stickstoffquelle auszunutzen, sondern kann nur den im Ammonium enthaltenen Stickstoff verwerten (HAUPTMANN, 1980).

b) Kulturmedien

Zur Anzucht wurde daher ein Kulturmedium verwendet, das Ammonium als Stickstoffquelle enthält. Es folgt in seiner Zusammensetzung weitgehend den Angaben von LOPPES (1966, 1969) und entspricht damit einem nach SUEOKA (1960) modifizierten Minimalmedium. Der Stickstoffgehalt wurde bei Versuchen zur Synchronisierung variiert (Verringerungen bis zu einem Viertel) und liegt für die besten Ergebnisse bei der Hälfte der empfohlenen Ammoniumchloridkonzentration, so daß sich für die Gebrauchslösung eine Konzentration von $0,2 \text{ mg/cm}^3$ (etwa $3,7 \text{ mol/m}^3$) ergibt. Das für die Gameteninduktion verwendete Medium war völlig stickstofffrei (SAGER und GRANICK, 1953,

1954). Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist bei HUTNER et al. (1950) beschrieben.

Für die Flüssigkultur zur Erzielung einer optimal erreichbaren Synchronisierung wurde folgende Zusammensetzung verwendet:

Lösung A	250 cm ³
Phosphatpuffer	250 cm ³
Magnesiumsulfatlösung	5 cm ³
Spurenelementlösung	5 cm ³
Aqua dest.	4.500 cm ³

Für andere Endvolumina wurden die einzelnen Volumina der Stammlösungen entsprechend geändert. Die Zusammensetzung der Stammlösungen ist nachfolgend aufgeführt (alle Substanzen von MERCK, Darmstadt):

Lösung A:	NH ₄ Cl	4,00 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,00 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,00 g
	Aqua dest.	1.000,00 cm ³
Phosphatpuffer:	K ₂ HPO ₄	14,34 g
	KH ₂ PO ₄	7,26 g
	Aqua dest.	1.000,00 cm ³
Magnesiumsulfatlösung:	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	24,60 g
	Aqua dest.	100,00 cm ³
Spurenelementlösung:	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ x 2 H ₂ O	5,00 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,20 g
	H ₃ BO ₃	1,14 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,51 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,49 g
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,16 g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,16 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,11 g
	Aqua dest.	100,00 cm ³

Für Festmedien wurde die doppelte Menge an Ammoniumchlorid eingewogen und 1,5 % Agar (DIFCO, Detroit) zugefügt. Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 45minütiges Autoklavieren bei ca. 395 K und etwa 2 bar.

Chloramphenicol (CAP) wurde von SERVA (Heidelberg) bezogen und bei 277 K im Kühlschrank über "Blaugel"-Trockenperlen (KALI-CHEMIE, Hannover) aufbewahrt. Zur Vermeidung von Zersetzungsreaktionen im Flüssigmedium wurde die pulverige Substanz erst kurz vor Versuchsbeginn zugegeben und durch Magnetrühren zur Lösung gebracht. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 2 mg/cm^3 (etwa $6,2 \text{ mol/m}^3$) war das Antibiotikum nach etwa 60 min gelöst. Die Grenzkonzentration für die Löslichkeit in Wasser dürfte nach FREEMAN (1970a) sowie BÖHME und HARTKE (1971) bei 3 mg/cm^3 oder etwa $9,3 \text{ mol/m}^3$ liegen. Eine Sterilisation wässriger CAP-Lösungen ist nicht möglich, da beim Autoklavieren eine Zersetzung von ca. 35 % eintritt (FALK und ZENGEL, 1978). Die Substanz wurde daher erst nach der Sterilisation des Mediums (inkl. Rührmagneten) zugegeben.

Die frisch angesetzte Nährlösung reagierte mit und ohne CAP-Zusatz neutral ($\text{pH} = 7$), nach Erreichen der stationären Wachstumsphase jedoch sauer ($\text{pH} \approx 3,5$).

c) Synchronisierung des vegetativen Zellzyklus

Gut synchronisierte vegetative Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* wurden von SCHLÖSSER (1966), PIRSON (1975) und SCHLÖSSER (1976) für eine nitratverwertende Kultur beschrieben. Der von uns gehaltene Stamm, der nur Ammonium als Stickstoffquelle verwendet, wurde bisher in Batchkulturen gezogen, wobei eine in Flüssigmedium angewachsene Kultur in einer bestimmten Zellzahl in einen Erlenmeyer-Kolben mit 300 cm^3 Medium übertragen und dann einem dreitägigen Licht-Dunkel-Wech-

sel von 12:12 h unterworfen wird. Die damit erreichbare Synchronitätsrate ist jedoch nicht ausreichend. Die Kultivierung in einem Algenzucht-Thermostaten (KNIESE, Marburg) mit täglicher automatischer Verdünnung zu Beginn des 24stündigen Zellzyklus (LORENZEN, 1959; KUHL und LORENZEN, 1964; SENGER und WOLF, 1964; PFAU et al., 1971; BISHOP und SENGER, 1971; SENGER et al., 1972; KIRSCHSTEIN, 1978) ermöglicht demgegenüber bessere Synchronisierungsergebnisse.

Der Algenzucht-Thermostat bietet weitgehend Konstanz und Regulierbarkeit der wichtigsten Wachstumsbedingungen wie Licht, Temperatur, Begasung, Nährlösungsversorgung und Kulturdichte. Er besteht aus einem mit Aqua dest. gefüllten Thermostatbecken, das mit einem doppelwandigen Beckenfenster versehen ist. Die Heizung für das Wasserbad ist eingebaut; zur Regelung einer gleichbleibenden Wassertemperatur dient ein eingebauter Wärmefühler, der nach geringfügiger Abkühlung durch die umgebende niedrigere Raumtemperatur (288 K) die Heizung im Rahmen eines Toleranzbereichs von $\pm 0,5$ K steuert. Messungen ergaben, daß die Temperatur des Kulturmediums in den Anzuchtröhren, die sich im Wasserbad befinden, vermutlich infolge der ständigen Vermischung aufgrund der Begasung sogar völlig konstant bleibt.

Die Beleuchtungseinrichtung umfaßt pro Beckenfenster neun Leuchtstoffröhren (fünf OSRAM "Warmton de Luxe" tWX 40W/32-1 kombiniert mit vier OSRAM "Soft Daylight" tWX 40W/51-1). Bei einer Beleuchtungsstärke von 20 klx an der Außenseite des Beckenfensters beträgt der Abstand zur Glasoberfläche etwa 14 cm. Die Beleuchtungsdauer kann innerhalb eines 24stündigen Rhythmus beliebig variiert werden; die beste Synchronisierungsrate wurde mit einer Hell-Dunkel-Periode von 14:10 h erzielt.

Das Wasserbad faßt insgesamt 20 Kulturröhren à 300 cm³. Über ein seitliches Glasrohr, das am Boden in die Röhre mündet,

kann die Gas- und Nährstoffzufuhr erfolgen. Für die Begasung der Kulturen mit 97 % Luft und 3 % CO₂ (Begasungsgeschwindigkeit etwa 200 cm³/min) ist pro Röhre ein Nadelventil vorhanden; die Nährstoffzufuhr kann jedoch nur für zwei Röhren gesteuert werden, die im unteren Drittel im Bereich einer im Wasserbad befindlichen Photozelle mattiert sind, um Streulichteffekte bei der Messung der optischen Dichte zu vermeiden. Nach Überschreiten einer bestimmten Zellzahl zu einem vorher zu determinierenden Zeitpunkt - hier ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/cm³ bei Lichtbeginn - gibt ein Steuergerät die Nährstoffzufuhr aus einer Vorratsflasche über einen bis dahin durch ein Magnetventil abgequetschten Schlauch frei und verdünnt die Kultur automatisch innerhalb eines wählbaren Zeitraums von minimal ca. 45 min auf die eingestellte Zellzahl. Die überschüssigen Zellen werden mit der überstehenden Lösung über eine Schlauchverbindung von oben weg nach außen gepreßt (vergl. HAUPTMANN, 1980).

Zur Anzucht wurde von geklonten Stammkulturen, die bei Dauerlicht von ca. 800 lx und gleichbleibender Temperatur von etwa 289 K über längere Zeit erhalten werden können, ein Teil auf Agarmedium übertragen und drei Tage bei einer Beleuchtungsstärke von 5 klx und einer Temperatur von 298 K angezogen. Hiervon wurde in ca. 2 cm³ sterilen Puffer suspendiert und in die Anzuchtröhren mit 300 cm³ Flüssigmedium überimpft. Das Inokulum von 1×10^4 bis 5×10^4 Zellen/cm³ erhöhte sich im Dauerlicht innerhalb 40 h auf eine Zelldichte von bis zu 3×10^6 Zellen/cm³ und nach Umschaltung auf den Licht-Dunkel-Wechsel von etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen/cm³ nach der täglichen Verdünnung bei Lichtbeginn bis auf 1×10^7 Zellen/cm³ nach Freisetzung der Tochterzellen. Nach vier Tagen Licht-Dunkel-Periodik, die der Anpassung aller Zellen an die äußere Rhythmik dienen sollen, konnte mit der Bestimmung der Synchronitätsrate begonnen werden, die nach einiger Zeit in der Regel ein bestimmtes Maximum erreichte, um danach meist wieder etwas abzusinken.

Zur Überprüfung der Wachstumsrate photoautotropher Kulturen in Gegenwart von CAP wurden vorsynchronisierte Zellen mit geringerer Zellzahl als üblich in frisches Medium suspendiert. Ausgehend von einer Zellzahl von ca. 5×10^4 Zellen/cm³ erreichte die Kontrolle dabei ihre maximale Zellzahl von etwa 1×10^7 Zellen nach drei Tagen.

Die Bestimmung von Zellzahl und Synchronitätsrate erfolgte nach Abtöten einer 2-cm³-Probe mit 3%igem Formalin in einer NEUBAUER-Zählkammer (HALLMANN, 1966) bei 250facher Mikroskopvergrößerung im Phasenkontrast. Zur Untersuchung dienten Proben aus der 1. Lichtstunde (nach der Verdünnung) sowie aus der 8. und 9. Lichtstunde, um eine eventuelle Zwischenteilung feststellen zu können. Von Beginn der Zellteilungen an, die etwa bei Beginn der Dunkelperiode einsetzen, müssen für genaue Synchronitätsbestimmungen alle 2 h Proben entnommen werden. Die Entnahmen während der Dunkelperiode erfolgten dabei bei schwachem Grünlicht (vergl. STRALEY und BRUCE, 1979). Aufgrund des Rauminhalts jedes der 16 Kleinquadrate in jedem der 8 großen Eckquadrate der Zählkammer von $6,25 \times 10^{-6}$ cm³ errechnet sich die Zellzahl nach folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl/cm}^3 = \frac{(\text{Anzahl der Algen}) \times (1,6 \times 10^5)}{\text{Anzahl ausgezählter Kleinquadrate}}$$

d) Gameteninduktion in Dunkelheit und Kälte

Wie bei der Gameteninduktion in Licht (vergl. GROBE, 1976) ist auch bei der Gametogenese in Dunkelheit und Kälte (ISHIURA und IWASA, 1973a, 1973b, 1973c; ISHIURA, 1976) die Abwesenheit von Stickstoff im Medium Grundvoraussetzung (SAGER und GRANICK, 1953, 1954). Die bei 293 K für eine Induktion noch nötige Belichtung zur Umstimmung vegetativer Kulturen

kann durch Absenkung der Temperatur auf mindestens 283 K umgangen werden (ISHIURA, 1976). Bei 277 K ist nach ISHIURA und IWASA (1973a) die Sexualität in Zellen, die kurz vor Lichtbeginn aus dem vegetativen Zyklus entnommen wurden, bereits nach 4 h voll induziert.

Für die Gameteninduktion wurden Zellen jeweils eines Paarungstyps sowohl unmittelbar vor Lichtbeginn als auch aus der 9. Lichtstunde entnommen, dreimal mit stickstofffreiem Medium gewaschen und in dieses Medium mit einer Zellzahl von etwa 2×10^6 Zellen/cm³ inokuliert. Jeweils 300 cm³ der Suspension wurden in Erlenmeyerkolben für 20 h, für einen Versuch auch für 60 h, bei 283 K in Dunkelheit gehalten und zur Vermeidung von Sauerstoffmangel (ISHIURA, 1976) mit Luft begast. Zur Bestimmung der Effizienz der Gameteninduktion wurden gleiche Teile von mt(+) und mt(-) vermischt und die sich bildenden vis-à-vis-Paare (im Dunkeln finden keine Fusionen statt) unmittelbar danach mit der NEUBAUER-Zählkammer bestimmt (vergl. oben), wobei sich der Prozentsatz der Paarbildungen folgendermaßen errechnet:

$$\% \text{ Paarbildungen} = \frac{2 \times (\text{Paare} : \text{Einzelne})}{2 \times (\text{Paare} : \text{Einzelne}) + 1} \times 100$$

2. PRÄPARATIONSTECHNIKEN, MORPHOMETRIE UND REKONSTRUKTION

a) Fixierung und Einbettung

Bei Fixierung mit Kaliummanganat(VII) heben sich die Membranen sehr kontrastreich vom Cytoplasma ab, doch können Fixierungsartefakte aufgrund des aggressiven Agens nicht ausgeschlossen werden. Es wurde daher auf die Fixierung mit dem relativ milden Glutaraldehyd mit anschließender Nachfixie-

rung in Osmiumtetroxid zurückgegriffen (vergl. GROBE, 1976). Verwendet wurden Lösungen von 2 % Glutaraldehyd und 1 % Osmiumtetroxid, jeweils in Collidinpuffer (50 mol/m^3 , $\text{pH} = 7,5$). Die Herstellung der Lösungen erfolgte wie nachstehend angegeben (alle Substanzen von MERCK, Darmstadt):

Collidinpuffer (50 mol/m^3 , $\text{pH} = 7,5$):

225 cm^3 Salzsäure (100 mol/m^3) werden mit Aqua dest. auf 900 cm^3 aufgefüllt, mit etwa 6 cm^3 2,4,6-Collidin auf $\text{pH} = 7,5$ eingestellt und mit Aqua dest. auf 1.000 cm^3 ergänzt.

2 % Glutaraldehyd in Collidinpuffer (50 mol/m^3 , $\text{pH} = 7,5$):

Nach dem Abzentrifugieren einer 25%igen Glutaraldehydlösung, um Ausfällungen zu entfernen, werden hiervon 4 cm^3 zu 46 cm^3 eingestelltem Collidinpuffer gegeben.

1 % Osmiumtetroxid in Collidinpuffer (50 mol/m^3 , $\text{pH} = 7,5$):

2 Ampullen zu je 100 mg kristallinem Osmiumtetroxid werden aufgesägt und in 5 cm^3 Aqua dest. gelöst; zu dieser 4%igen Lösung werden kurz vor Fixierungsbeginn 15 cm^3 eingestellter Collidinpuffer gegeben.

Die für die Sedimentierung der zur Einbettung kommenden Zellen nötige Zentrifugation wurde für das Abernten der Kulturen und die einzelnen Waschstufen bis zur Entwässerung bei ca. 10 km/s^2 (jeweils 5 min) durchgeführt, danach bei ca. 18 km/s^2 (jeweils 3 min).

Zur Einbettung wurde das von SPURR (1969) beschriebene Medium verwendet, das jeweils frisch vor einer Einbettung in folgender Zusammensetzung gemischt wurde (alle Substanzen von SERVA, Heidelberg):

SPURR-Gemisch:	ERL-4206 (Vinylcyclohexendioxid)	20,0 g
	DER-736 (Diepoxid)	12,0 g
	NSA (Nonenylbernsteinsäureanhydrid)	52,0 g
	DMAE (2-Dimethylaminoethanol)	0,8 g

Um beim Übergang von der Entwässerung zur Einbettung den häufigeren Wechsel des Übergangsgemisches aus Propylenoxid und SPURR-Medium in einer aufsteigenden Reihe von 3:1, 1:1 und 1:3 vermeiden zu können, wurden die Zellen zunächst in ein

Tab. 1: Übersicht über den Ablauf von Fixierung und Einbettung für Zellkulturen von *Chlamydomonas reinhardtii*

Stufe	Medium	Dauer	Temperatur
Fixieren	2 % Glutaraldehyd in Collidinpuffer	90 min	Eisbad
Waschen	Collidinpuffer	4 x 15 min ^{a)}	Eisbad
Nachfixieren	1 % Osmiumtetroxid in Collidinpuffer	60 min	Eisbad
Waschen	Collidinpuffer	2 x 15 min	Eisbad
Entwässern	50 % Ethanol	5 min	Raumtemp.
	80 % Ethanol	5 min ^{a)}	Raumtemp.
	90 % Ethanol	5 min	Raumtemp.
	95 % Ethanol	5 min	Raumtemp.
	abs. Ethanol	2 x 5 min	Raumtemp.
	Propylenoxid	2 x 15 min	Raumtemp.
Einbetten	1:1-Mischung aus Propylenoxid und SPURR-Medium	60 min rotierend mit Stopfen, dann 8 h ^{a)} ohne Stopfen	Raumtemp.
	pures SPURR-Medium	60 min	Raumtemp.
Polymerisieren	pures SPURR-Medium	8 h ^{a)}	ca. 340 K

a) zur entsprechenden zeitlichen Disposition können die Proben in diesen Stufen über Nacht verbleiben

1:1-Gemisch suspendiert und in den Einbettungsgläschen in Schräglage an einer langsam drehenden Bohrmaschine belassen, wobei die Gläser während der ersten 60 min mit Stopfen verschlossen waren. Danach wurden die Stopfen abgenommen, so daß das bei Raumtemperatur flüchtige Propylenoxid aus dem Gemisch entweichen konnte. Nach etwa 8 h blieb pures SPURR-Medium zurück.

Man konnte zu diesem Zeitpunkt zwar davon ausgehen, daß das ursprünglich in den Zellen vorhandene Propylenoxid durch das reine Einbettungsgemisch völlig verdrängt war, doch wurden die Proben nochmals in frisches SPURR-Medium übertragen und für eine weitere Stunde in Rotationslage belassen. Zur Einkapselung wurden die Zellen letztmalig abzentrifugiert und je 1 bis 2 Tropfen des Sediments in Gelatine kapseln von $0,36 \text{ cm}^3$ Inhalt (magenlösliche "Capsulae operculatae" von POHL-BOSKAMP, Hohenlockstedt) gegeben. Die Kapseln wurden mit reinem Kunststoff aufgefüllt und zum Polymerisieren für mindestens 8 h in einen Trockenschrank bei etwa 340 K gestellt.

Der zeitliche Ablauf von Fixierung und Einbettung ist in Tab. 1 dargestellt.

b) Ultradünnschnittserientechnik und Elektronenmikroskopie

Nach dem Entfernen der Gelatine von den ausgehärteten Kapseln mit warmem Wasser wurden die Blöckchen im Trimmgerät TM-60 (REICHERT, Wien) in Form eines Pyramidenstumpfes zugespitzt. Die resultierende Fläche wurde nicht als Quadrat bzw. Rechteck gewählt, sondern durch Veränderung des Antrimmwinkels und damit der an einer Seite anliegenden Winkel auf $\neq 90^\circ$ als Trapez. Die Unterkante der Schnittfläche war somit länger als die Oberkante. Dadurch wurde die spätere Orientierung

der Schnitte im Elektronenmikroskop erleichtert. Die Kantenlänge des Trapezes betrug nach dem Zuspitzen des Blöckchens etwa 100 bis 150 μm , der für die spätere Bestimmung der mittleren Schnittdicke zu bestimmende Neigungswinkel des Pyramidenstumpfes meist 41° .

Mit einem Ultramikrotom OMU-2 (REICHERT, Wien) wurden unter Verwendung eines Diamantmessers (DIATOME, Biel) Ultradünnschnitte angefertigt, die in der Regel gelblich-silberne bis hellgoldene Interferenzfarben zeigten. Da Dickenbestimmungen an Epon-Araldit-Schnitten für diese Interferenzfarben bereits den großen Varianzbereich von 66,5 bis 89 nm ergeben (YANG und SHEA, 1975), wurde die für den späteren Modellbau und für die morphometrischen Auswertungen sehr wichtige mittlere Schnittdicke für jede einzelne Serie neu bestimmt, und zwar erst anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dabei wurden zwei verschiedene Wege beschritten (ARNOLD und GAFFAL, 1979b): Am einfachsten erhält man die mittlere Schnittdicke bei einem weitgehend um die Längsachse rotations-symmetrisch-ellipsoidal gebauten Untersuchungsobjekt wie Chlamydomonas aus einer Längsschnittserie, wobei der Durchmesser an der breitesten Stelle des Medianschnitts durch die Zelle bei Teilung durch die Anzahl der Schnitte relativ genau den gesuchten Wert ergibt. Etwas aufwendiger, jedoch von der Schnittrichtung unabhängig ist die Bestimmung, wenn man von dem Neigungswinkel α der Pyramidenflächen und der mit der wachsenden Zahl der Schnitte anwachsenden Differenz der Kantenlängen der Schnittflächen ausgeht. Man erhält die mittlere Schnittdicke $\bar{d}$ dann nach der Formel:

$$\bar{d} = \frac{(\overline{CD} - \overline{AB})}{2 \times n \times \tan \alpha}$$

Die gegebenen Werte sind dabei: $\overline{CD}$ = Kantenlänge nach dem Abtragen einer bestimmten Zahl von Schnitten; $\overline{AB}$ = ursprüngli-

che Kantenlänge; n = Zahl der Schnitte; α = Neigungswinkel des Pyramidenstumpfes.

Beim Anfertigen der Serienschritte wurde darauf geachtet, möglichst Schnittbänder mit etwa 10 Schnitten pro Band herzustellen. Die Schnitte wurden auf kupfernen Lochgrids (VECO, Solingen) mit einem Lochdurchmesser von 3,05 mm aufgefangen, die mit PIOLOFORM-F (WACKER-CHEMIE, München) aus einer Stammlösung von 1,5 % in Chloroform zu hellgoldenen bis goldenen Interferenzfarben beschichtet waren (vergl. STOCKEM, 1970). Nach dem Strecken der durch das Abschneiden gestauchten Schritte mittels Überstreichen der Bänder mit einem in Xylol getränkten Holzstäbchen in geringer Höhe über der Wasseroberfläche des Messerbeckens wurden die darauf schwimmenden Bänder mit einer an einer Pasteurpipettenspitze dünn ausgezogenen Teflonspitze auf den befilmten Lochrand eines bis dorthin schräg untergetauchten Grids gekehrt und das Grid nach dem Anheften des Schnittbands schräg nach oben aus dem Wasser herausgezogen.

Die Schritte wurden zuerst für 5 min in einer 10%igen Lösung von Uranylacetat in Methanol kontrastiert und nach 2maligem Waschen mit Methanol, einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Aqua bidest. und schließlich mit reinem Aqua bidest. dann 5 min lang in 0,2%iger Bleicitratlösung nach VENABLE und COGESHALL (1965) nachkontrastiert.

Für die Elektronenmikroskopie und die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein EM-10 (ZEISS, Oberkochen) verwendet. Für Serienaufnahmen wurde je nach der Zellgröße der zu photographierenden Serie eine Primärvergrößerung zwischen 6.200:1 und 10.000:1 gewählt, bei der die Zelle in ihrer größten Ausdehnung das zu belichtende Format der Planfilme (6,3 cm x 7,8 cm) nicht überschritt. Die Sekundärvergrößerung mittels Dunkelkammervergrößerer zur Anfertigung der Positive lag bei dem Faktor 1,6.

c) Graphische dreidimensionale Rekonstruktion und Morphometrie

Dreidimensionale Rekonstruktionen kann man entweder mit graphischen Mitteln oder über den Bau von Modellen durchführen. In jedem Fall beginnt man mit der graphischen Methode, indem man die Umrisse der gesuchten Strukturen jedes Schnittes auf transparente Folien überträgt und in der richtigen Reihenfolge passend übereinanderstapelt.

In Anlehnung an SCHÖTZ (1972), GROBE (1976) sowie GAFFAL und KREUTZER (1977) wurden für die vorliegende Arbeit die Membranamrisse von Plasmalemma, Kern, Mitochondrien und teilweise auch die des Chloroplasten über einem Leuchtkasten von den Positiven auf Transparentpapier übertragen. Der Verlauf der einzelnen Organellen-Anschnitte war dadurch von Schnitt zu Schnitt zu verfolgen. Durch Bezifferung der Profile und die protokollarische Erfassung des Neuauftretens, des Verschwindens oder der Vereinigung von Anschnitten konnte sowohl die genaue Mitochondrienzahl festgestellt als auch ein grober Überblick über die Verteilung der Organellen in der Zelle gewonnen werden.

Sehr schwierig und bisweilen subjektiv war dagegen die quantitative Erfassung der als mitochondrielle Untereinheiten in dieser Arbeit neu zu definierenden "Lobuli", mitochondrieller Bausteine, die als kleinste, ovoide Mitochondrien auch als freie, unfusionierte Einheiten auftreten können, oft aber zu länglichen oder verzweigten Gebilden fusioniert sind (s. V 1 a; vergl. die in Abb. 2, 10, 17 dargestellten Mitochondrienmodelle). Während der Lobulierungsgrad nach erfolgtem Modellbau relativ problemlos durch Abzählen der pro Mitochondrium vorhandenen Lobuli bestimmt werden konnte, war dies bei nur graphisch durchgeführten dreidimensionalen Rekonstruktionen nur annäherungsweise durch protokollarische Erfassung des mitochondriellen Formenwechsels bzw. von Abschnürungen innerhalb eines einzigen Mitochondriums möglich. Andererseits zeigte die nach Mo-

modellbau vorgenommene Überprüfung der durch vorherige graphische Rekonstruktion ermittelten Lobulierung größenordnungsmäßig keine Unterschiede, so daß die graphische Lobulierungsbestimmung zum Zweck der vollständigen Übersicht beibehalten wurde.

Die quantitativen morphometrischen Bestimmungen wurden mit einem Digiplan-MOP (KONTRON, München) durchgeführt. Dabei wurden durch das Umfahren der Flächenumrisse des Plasmalemmas bzw. der einzelnen Organellen in jedem Zellanschnitt die einzelnen Flächen elektronisch gemessen, die Werte aus den jeweils zusammengehörenden Flächen (also z. B. für jedes Einzelmitochondrium) in bis zu zehn verschiedenen Kanälen aufaddiert, gespeichert und schließlich auf Abruf ausgedruckt. Durch Multiplikation jeder auf Lebensgröße umgerechneten Flächensumme mit der ermittelten mittleren Schnittdicke konnten schließlich die gesuchten Volumina (in μm^3) erhalten werden.

d) Modellbau

Wenn genauere Kenntnisse über die räumlichen Verhältnisse wünschenswert erscheinen, muß ein Modell gebaut werden, das zwar den Vorteil der unmittelbaren räumlichen Betrachtung bietet, jedoch nur unter relativ großem Arbeitsaufwand herzustellen ist. Für die vorliegende Arbeit wurden daher nur Modelle des Mitochondrienbestands von sechs Zellen angefertigt, für eine Zelle zusätzlich ein Modell des Chloroplasten und des Kerns (Abb. 2), um die natürliche Anordnung der Einzelmitochondrien und des Kerns in Bezug auf den Chloroplasten darstellen zu können.

Dazu wurde die mittlere Schnittdicke einer zu rekonstruierenden Zellserie gleichgesetzt mit der mittleren Schichtstärke einer Styroportapete (für eine mittlere Schnittdicke von 75

nm wurde also z. B. eine 3 mm starke Styroportapete gewählt). Dadurch ergab sich nach der Division des Quotienten aus der Stärke der Tapete und der mittleren Schnittdicke, der der Modellvergrößerung entspricht, durch die bereits durchgeführte Primär- und Sekundärvergrößerung der Originalgröße der Zelle (beispielsweise einer Endvergrößerung von 12.800:1) als zusätzlicher Vergrößerungsfaktor die Tertiärvergrößerung (in diesem Fall etwa 3,1 für die Gesamtvergrößerung des Modells von ca. 40.000:1). Über einen auf diese Tertiärvergrößerung eingestellten Dunkelkammervergrößerer wurden die auf Transparentpapier abgezeichneten Profile auf die Styroporplatten übertragen, wobei in jedem Fall die Cytoplasmamembran als Grenzstruktur mitgezeichnet wurde.

Die Umrisse der Zelle und der Organellen wurden danach mit einer Thermosäge (FISCHERTECHNIK, Tümlingen) aus den Platten herausgeschnitten und mit Styroporkleber (UHU, Bühl) paßgerecht zusammengeklebt. Dabei dienten die Transparentzeichnungen und die ausgeschnittenen Zellumrisse als Leitstrukturen, die durch das Herausschneiden der Organellenprofile entstandenen Löcher als Schablone. Nach dem Zusammenfügen aller Modellteile wurden die Kanten geglättet und die Mitochondrien zur besseren Stabilisierung mit Triton-Volltonfarbe (KREUL, Forchheim) lackiert. Bei Gebrauch von styroporverträglichem Buntlack-Seidenmattspray (MARABU, Tamm), der in einem Fall für Chloroplast und Kern verwendet wurde, ist wegen der Löslichkeit des verwendeten UHUpor-Klebers im Lösungsmittel des Lacks Vorsicht geboten.

III. VORVERSUCHE

1. VERSUCHE ZUR SYNCHRONISIERUNG UND

GAMETOGENESE IN DUNKELHEIT UND KÄLTE

a) Optimierung der Kulturbedingungen zur Synchronisierung

Bei der vergleichenden Auswertung von Zellen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien mittels dreidimensionaler Rekonstruktion und morphometrischer Analysen anhand von Ultradünnschnittserien ist es für bestimmte Fragestellungen von Nutzen, wenn Synchronkulturen vorliegen, in denen sich alle oder zumindest der überwiegende Teil der Zellen im gleichen Entwicklungsstadium befinden. Ein gewisser Nachteil für Elektronenmikroskopiker besteht andererseits bei der Verwendung von Synchronkulturen darin, daß jedes zu untersuchende Stadium einer anderen Kultur zu entnehmen ist, während aus Asynchronkulturen alle Stadien gleichzeitig eingebettet werden können. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit dürfte jedoch der Vorteil einer durch Synchronisierung erreichbaren, klar zu definierenden Kontrolle gegenüber den mit CAP behandelten Zellen eindeutig vorzuziehen sein.

Wie bereits unter II 1 c erwähnt wurde, ist für den bei uns kultivierten Stamm *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT mt(+) und mt(-) nur eine Anzuchtmethode in Batchkulturen erprobt, die nicht zu optimalen Synchronisierungsergebnissen führt. Bereits beschriebene Methoden für eine optimierte Synchronisierung (SCHLÖSSER, 1966, 1976) konnten andererseits nicht übernommen werden, da unser Stamm nur Ammonium als Stickstoffquelle verwertet. Es war daher nötig, verschiedene Kulturbedingungen zur Synchronisierung des vegetativen Lebenszyklus dieses Stammes auszutesten, um gute Synchronitätsraten zu erhalten.

Aufgrund der systematischen Untersuchungen von HAUPTMANN (1980), wobei verschiedene Variable wie Lichtdauer, Temperatur und

Nährmedium eingehend überprüft wurden, gelang es schließlich, durch Absenkung des Stickstoffangebots den immer wieder auftretenden synchronitätslimitierenden Faktor einer Teilungs-

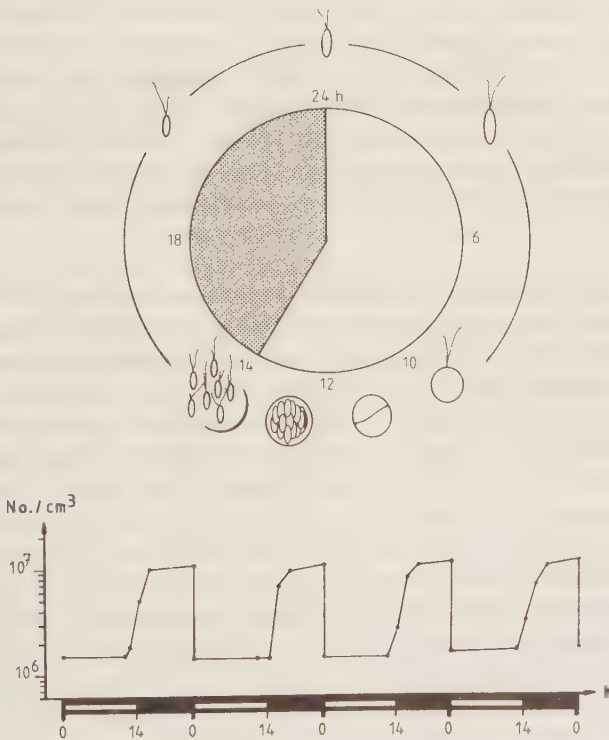


Abb. 4: Ablauf des vegetativen Zellzyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT mt(+) unter synchronisierenden Bedingungen (oben) und Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Sporulation bzw. nach automatischer Verdünnung zu Beginn der Belichtungszeit während des Licht-Dunkel-Wechsels von 14:10 h (unten)

hemmung bzw. Enzystierung der Teilungsstadien in Doppel- und sogar Dreifachsporangien auszuschalten ("Himbeerstadien"; LORENZEN, 1962). Dabei kam es besonders bei höheren Kultivierungstemperaturen möglicherweise durch ein Überangebot an Ammonium aufgrund der täglich frischen Zufuhr in den Verdünnungskulturen nach der Teilung innerhalb der Mutterzellen nicht zur Sporenfreisetzung (vergl. ISHIURA und IWASA, 1973a; LIEN und KNUTSEN, 1979). Vielmehr teilten sich die in der Mutterhülle verbleibenden Tochterzellen erneut innerhalb der großmütterlichen Hülle, die gallertig aufzuquellen schien, um schließlich palmellenähnliche Stadien zu bilden. Nach der von DILL (1895) für *Chlamydomonas reinhardtii* ursprünglich angegebenen Nomenklatur könnten diese Formen mit den von CIENKOWSKY (1865) als *Gloeocystis*-Stadien beschriebenen Formen identisch sein.

Die höchste Synchronität von *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT mt(+) wurde bei einer Anzuchttemperatur von 303 K, einer Ammoniumchloridkonzentration von $0,2 \text{ mg/cm}^3$ Medium und einem Hell-Dunkel-Wechsel von 14:10 h erzielt; WT mt(-) erreichte die besten Werte mit 307 K bei sonst gleichbleibenden Bedingungen (HAUPTMANN, 1980). Abb. 4 zeigt den synchronisierten Ablauf des vegetativen Zellzyklus von WT mt(+); der darunter befindliche Kurvenverlauf zur Zellzahl (Ansteigen der Zellzahl bei der Sporenfreisetzung, Abfall bei der Verdünnung zu Beginn jeder Lichtzeit) täuscht allerdings über den Synchronitätsgrad hinweg - nach strengen Kriterien sind maximal 80 % der Zellen synchron in bezug auf die Sporenfreisetzung. Der mitochondrielle Subzyklus verläuft vermutlich ebenso wie Kern- und Chloroplastenteilung weniger synchron (MIHARA und HASE, 1971a).

Da die Zellen in der Zeit nach der Sporenfreisetzung während der Dunkelperiode kein oder nur unmerkliches Wachstum zeigen, kann davon ausgegangen werden, daß zu Beginn der Lichtzeit praktisch derselbe Synchronitätsgrad vorliegt wie bei der Spo-

renfreisetzung. Bei der Behandlung mit CAP wurde daher überwiegend dieses Stadium als Ausgangskultur verwendet, um den geschädigten Zellen eine möglichst klar definierbare Kontrolle gegenüberstellen zu können.

b) Dunkel-Kälte-Induktion

Für die Durchführung von Versuchen zur Gametogenese in Dunkelheit und Kälte sprachen zwei Gründe: Einerseits sollte gezeigt werden, ob Unterschiede im Mitochondrienbestand bestehen zwischen solchen Zellen und den von GROBE und ARNOLD (1975) beschriebenen Gameten nach Hellinduktion; andererseits unterdrückt CAP die Gametogenese unter diesen Bedingungen nicht (ISHIURA und IWASA, 1973b; ISHIURA, 1976), so daß sich diese Gametogenese auch für vergleichende Untersuchungen an behandelten Kulturen eignet. Da im Gegensatz zur Lichtinduktion von Zellen aus der 9. Lichtstunde (GROBE und ARNOLD, 1975) während der Dunkelinduktion auch keine gametogenetische Teilung auftritt und die Zellen auch nicht heranwachsen, ist die hier parallel zu den Versuchen mit CAP angesetzte Kontrollkultur nicht nur eine Kontrolle per definitionem, sondern de facto.

Die durchgeführten Versuche orientierten sich im wesentlichen an ISHIURA (1976), dessen Angaben auf früheren Untersuchungen aufbauen (ISHIURA und IWASA, 1973a, 1973b, 1973c). Nach ISHIURA und IWASA (1973c) fluktuert die Sexkompetenz von Zellen in synchronisierten vegetativen Kulturen, die als Ausgangsstadien dienen, mit dem Licht-Dunkel-Zyklus und ist relativ hoch in der letzten Phase der Dunkelperiode bis zur frühen Lichtphase, am höchsten am Ende der Dunkelperiode und am niedrigsten in der frühen Dunkelphase bzw. zu der Zeit, wo die Tochterzellen aus den mütterlichen Sporangien entlassen werden.

Zur Induktion kamen daher Zellen aus dem vegetativen Ausgangsstadium $t = 0$, das unmittelbar vor Lichtbeginn vorliegt. Zum Vergleich mit früheren Angaben zum Mitochondrienbestand in Zellen der 9. Lichtstunde des vegetativen Zyklus (OSAFUNE et al., 1975c) bzw. zu aus diesem Stadium lichtinduzierten Gameten (GROBE und ARNOLD, 1975) wurden auch Zellen aus diesem Stadium bei $t = 9$ der Dunkel-Kälte-Gametogenese unterworfen.

Die Zellen wurden für 20 h den in II 1 d beschriebenen Bedingungen ausgesetzt, waren aber auch noch nach 60 h vollbeweglich. Bei der Auszählung der Paarbildungsrate zur Überprüfung der Effizienz der Gametogenese mußte allerdings festgestellt werden, daß die erzielten Werte von maximal 20 % nicht an die von ISHIURA (1976) angegebenen heranreichten, der eine vergleichbare Aktivität wie bei hellinduzierten Gameten finden konnte.

Vergleichende lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten andererseits ein eindeutig anderes Verhalten dieser Zellen nach der Dunkel-Kälte-Gametogenese als die vergleichbaren vegetativen Stadien. Das für Gameten typische Schwärmen und Aufsuchen von Geißelkontakt entsprach durchaus den Verhältnissen bei lichtinduzierten Zellen. Für den Paarungstyp WT mt(-) gilt, daß sogar unter Zellen desselben Typs Geißelkontakt gesucht wurde.

Elektronenmikroskopisch erkennbare sichere Kriterien für Gameten wie Zellwandablösung oder Ausbildung einer gametenspezifischen Struktur (Gamosom, Choanoid Body) konnten dagegen nur in wenigen Fällen gefunden werden. Die Frage, inwieweit es sich bei den unseren Bedingungen unterworfenen Zellen um kopulationsbereite Gameten oder aber Vorgameten bzw. latente Gameten im Sinn von ISHIURA und IWASA (1973c) handelt, kann daher nicht beantwortet werden,

2. VERSUCHE MIT CHLORAMPHENICOL

a) Wachstumsraten in Gegenwart von Chloramphenicol zur Ermittlung sensitiver Stadien im Zellzyklus

Da unterschiedliche Organismen auf verschiedene zur Proteinbiosynthesehemmung eingesetzte Antibiotika unterschiedlich reagieren können, sollten für eigene Untersuchungen niemals fremde Ergebnisse als Ausgangspunkt für Konzentrationen oder besonders sensitive Zellzyklusstadien herangezogen werden. Für die geplanten Untersuchungen zur Veränderung der Ultrastruktur war es daher nötig, zunächst die Konzentrationen für unterschiedliche Wachstumshemmungen in den eigenen Zellkulturen und danach eine evtl. unterschiedliche Beeinflussung der Wachstumsrate in Abhängigkeit von verschiedenen Zellzyklusstadien auszutesten.

Vorwiegend zur Inhibierung der plastidären Proteinbiosynthese durch CAP wurden bei *Chlamydomonas reinhardtii* meist sehr geringe bis mittlere Konzentrationen eingesetzt (10 bis 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$), doch sind die Angaben über die Effizienz der dadurch erreichbaren Inhibierung sehr unterschiedlich (HUDOCK et al., 1964; JACOBSON et al., 1964; MORRIS, 1966; SURZYCKI et al., 1970; GOODENOUGH, 1971; GOODENOUGH und LEVINE, 1971; GOODENOUGH et al., 1971; SURZYCKI und GILLHAM, 1971; HONEYCUTT und MARGULIES, 1973; HUISMAN et al., 1979). Dies gilt ebenfalls für die Angaben einer Hemmung verschiedener Zellzyklusstadien (LAWRENCE und DAVIES, 1967; SCHOR et al., 1970; MIHARA und HASE, 1971a, 1971b; HOWELL et al., 1975; DRON et al., 1978). Ausgehend von dem Laborwissen, daß frisch von der Platte genommene Agarkulturen meist hypersensibel reagieren, Mutanten vielfach empfindlicher sind als der Wildtyp (SCHIMMER und ARNOLD, 1970) und WT mt(-) in der Regel leichter zu schädigen ist als WT mt(+) (RANNEBERG und ARNOLD, 1968), wurden daher verschiedene CAP-Konzentrationen

in Abhängigkeit von Paarungstyp, Einimpfungsstadium und Kultivierungsbedingungen ausgetestet.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung abgetöteter Zellen fiel zunächst auf, daß in bestimmten Zellregionen Pigmentverschiebungen auftraten. Diese Veränderungen waren konzentrations- und zeitabhängig und betrafen nie alle Zellen, waren jedoch auch bei Kulturen zu beobachten, die heterotroph im Dunkeln angezogen wurden. Dies dürfte in Übereinstimmung stehen mit der Beobachtung von CAHEN et al. (1977), die bei *Chlamydomonas reinhardtii* nach 9stündigem Wachstum mit einer CAP-Konzentration von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ bereits einen Chlorophyllverlust bis zur Hälfte von normal differenzierten Zellen erhielten. Der Einfluß auf den Pigmentstoffwechsel verschiedener Algen war bereits von CZYGAN (1964a, 1964b) beschrieben worden. Dabei konnte insbesondere Chlorophyllabbau, gestörter Abbau von Primärkarotinoiden und gestörter Aufbau von Sekundärkarotinoiden nachgewiesen werden.

Bei der Überprüfung photoautotropher Kulturen unter synchronisierenden Bedingungen mußte festgestellt werden, daß die Synchronität unter CAP-Einfluß nicht erhalten bleibt. Selbst bei Verwendung niedriger Dosierungen kam es zunächst zu einem Aussetzen der Weiterentwicklung, die allerdings in Abhängigkeit von Konzentration und Zellstadium später wieder einsetzte. Dabei erhielten sich die Zellen nie gleichzeitig, so daß bestenfalls noch eine Teilsynchronisierung vorlag, die dem Entwicklungsablauf der Kontrollkultur nachhinkte. Wurde diesen Kulturen das Anwachsen über den Zeitpunkt hinaus ermöglicht, zu dem die Kontrolle ihre höchste Zellzahl von etwa 1×10^7 Zellen/ cm^3 erreicht hatte, so erreichten sie in etwa dieselbe Zellzahl, das Medium in etwa den gleichen pH-Wert von ca. 3,5. Offenbar ist dieser Wert in der Tat als Wachstumslimit für *Chlamydomonas*-Kulturen anzusehen (FRANK, 1904; ARTARI, 1913; LUCKSCH, 1933), der durch niedrige CAP-Dosen nicht beeinflusst wird.

Hohe CAP-Konzentrationen (bis zu 2 mg/cm^3) wirken im Gegensatz dazu als nahezu vollständige Entwicklungsblocker. Diese Blockierung der Zellentwicklung wurde nicht aufgehoben; die Zellen waren allerdings noch lange Zeit beweglich, bis sie schließlich abstarben. Mixotrophe Kulturen wurden dabei weniger gehemmt als autotroph wachsende Zellen. Wurden noch bewegliche Zellen in frisches Kulturmedium ohne CAP-Zusatz übertragen, so setzten sie dort ihre Weiterentwicklung fort, allerdings völlig asynchron.

Im Gegensatz zu der eben beschriebenen CAP-Behandlung mit intermittierender Belichtung zeigten Dauerlichtversuche eine ungleich höhere Hemmung, die bei empfindlichen Stadien nach spätestens 24 h zum Tod führte. Wurden unbehandelte Zellen aus einer Kontrollkultur in eine für 24 h belichtete Lösung mit einer CAP-Konzentration von 2 mg/cm^3 überimpft, so starben sie innerhalb 15 min ab. Da die Lösung eine Gelbfärbung zeigte (vergl. ISHIURA und IWASA, 1973b), ist anzunehmen, daß toxische Zersetzungsprodukte hier als Ursache anzusehen sind.

Auf die Zersetzbarkeit von CAP durch Sterilisation wurde bereits hingewiesen (II 1 b; vergl. III 2 b). In Kulturen, die vergleichsweise in Medien mit mitautoklaviertem CAP angezogen wurden, war bis zu 40 % weniger Hemmung festzustellen als bei danach zugesetztem CAP. Dies steht in guter Übereinstimmung mit einer durch Autoklavieren nachgewiesenen Zersetzung des Antibiotikums von ca. 35 % (FALK und ZENGEL, 1978).

Da die Dauerlichtbehandlung zur Untersuchung der Wachstumshemmung in Gegenwart von CAP ausschied, heterotrophe Kulturen ein ausgesprochen dürftiges Wachstum zeigten und bei der Anzucht von mixotrophen Vorkulturen nicht mit später verwertbaren Synchronitätsergebnissen gerechnet werden könnte, verblieb zur Untersuchung der Wachstumshemmung nur die Möglich-

keit der Anzucht in autotroph wachsenden Hell-Dunkel-Kulturen. Auch wenn die später zur Einbettung kommenden Zellen aus Gründen der CAP-Instabilität nur kurze Zeit einer Behandlung unter diesen Bedingungen ausgesetzt werden sollten, wurden zur Wachstumsbestimmung zwei- bis dreitägige Versuche durchgeführt. WT mt(-) reagierte dabei sensibler als WT mt(+); da von WT mt(+) aber besser vorsynchronisierte Kulturen erhalten werden konnten, wurde für die nachfolgenden Versuche nur dieser Paarungstyp verwendet.

Bei der Auswertung von Wachstumsversuchen in Abhängigkeit von verschiedenen CAP-Konzentrationen und unterschiedlichen Einimpfungszeiten vorsynchronisierter vegetativer Zellzyklusstadien zeigte sich eine wechselseitige Abhängigkeit des nach 24 h erreichten Prozentsatzes des Wachstums der Kontrolle (Abb. 5). Die Wachstumshemmung nahm bei niederen Konzentrationen bis zu $250 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ in den vier untersuchten Einimpfungszeiten $t = 0$, $t = 6$, $t = 9$, $t = 12$, also von Beginn der Belichtungszeit bis zur 12. Lichtstunde, in der Reihenfolge von $(t = 0) > (t = 9) > (t = 12) > (t = 6)$ zunächst ab, erfuhr dann bei einer Konzentration von $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ eine Änderung zu $(t = 0) > (t = 9) \approx (t = 6) > (t = 12)$ und veränderte sich für die hohen Konzentrationen bis zu $2.000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ weiter zu $(t = 0) \approx (t = 6) > (t = 9) > (t = 12)$. Diese letzte Reihe ergibt damit die Reihenfolge der Zellstadien im Verlauf des vegetativen Zellzyklus von Beginn der Belichtungszeit bis zur 12. Lichtstunde.

Für die Wachstumshemmung nach 48 h ergab sich dieselbe Reihenfolge, wobei sich mit steigender CAP-Konzentration die Werte allerdings angleichen (Abb. 6).

Die Wachstumsbeeinflussung ist für das Zellstadium von $t = 0$, das bei Belichtungsbeginn vorliegt, offenbar am größten. Die tatsächlich erreichte Zellzahl nach bis zu dreitägigem Wachstum war bei dieser Einimpfungszeit am geringsten; mit einer

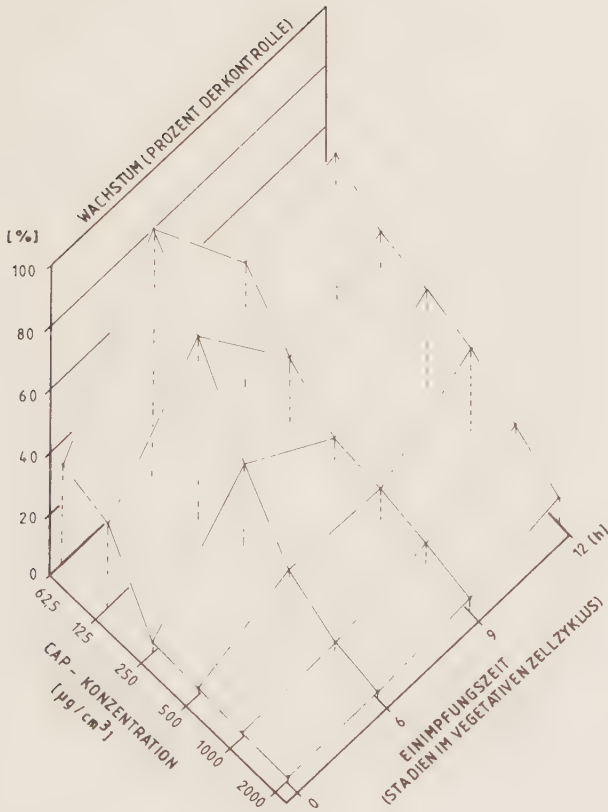


Abb. 5: Wachstumskapazität photoautotropher Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT mt(+) in Abhängigkeit von CAP-Konzentration und zur Einimpfungszeit vorliegenden Zellzyklusstadien: Dargestellt ist der nach 24 h erreichte Prozentsatz des Wachstums der Kontrolle (die gestrichelten Lote kennzeichnen den über dem Nullniveau liegenden Prozentsatz)

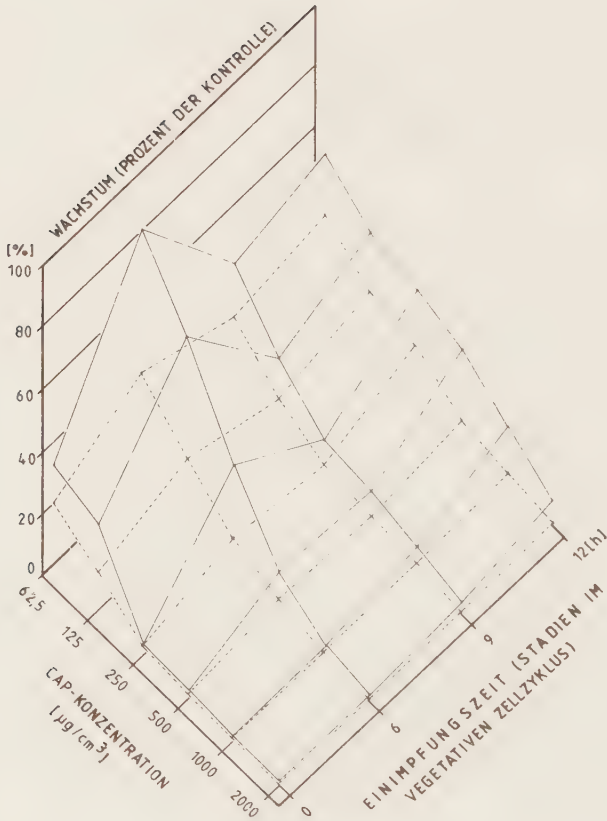


Abb. 6: Wachstumskapazität photoautotropher Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT mt(+) in Abhängigkeit von CAP-Konzentration und zur Einimpfungszeit vorliegenden Zellzyklusstadien: Dargestellt sind der nach 24 h (durchgezogene Linien) und der nach 48 h (gestrichelte Linien) erreichte Prozentsatz des Wachstums der Kontrolle

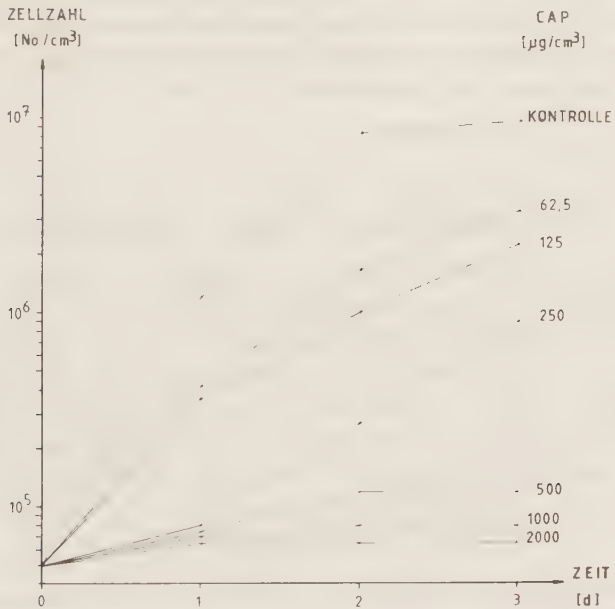


Abb. 7: Wachstumsbeeinflussung photoautotropher Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* 137c WT mt(+) durch verschiedene CAP-Konzentrationen bei einer Einimpfungszeit zum Zellzyklusstadium von $t = 0$: Dargestellt ist die tatsächlich erreichte Zellzahl nach 24, 48 und 72 h

CAP-Konzentration von 2 mg/cm^3 konnte nahezu vollständige Hemmung erreicht werden (Abb. 7). Da von vorsynchronisierten Kulturen ausgegangen wurde, traten Restteilungen keinesfalls vor 12 h nach Einimpfung auf, so daß zumindest bis zu diesem Zeitpunkt von synchron geblockten Zellen gesprochen werden kann. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung von CAP-Effekten an Zellen aus Belichtungskulturen wurden die Zellen daher für maximal 12 h behandelt; dies erschien auch im Hinblick auf die Zersetzungskinetik des Antibiotikums noch vertretbar.

b) Dunkel-Kälte-Induktion in Gegenwart von Chloramphenicol

Bereits REBSTOCK et al. (1949) konnten eine heterolytische Zersetzung von CAP in 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)-propan-1,3-diol und Dichloressigsäure nachweisen, die von SAHLI et al. (1965), ALI (1978) sowie FALK und ZENGEL (1978) bestätigt wurde; zusätzlich können auch weitere Substanzen als Nebenprodukte anfallen. Diese Hydrolyse ist lichtunabhängig, jedoch temperaturabhängig - bei 285 K sind für eine 10%ige Zersetzung beispielsweise noch etwa 2.660 h, bei 298 K nur noch 960 h und bei 333 K nur mehr 60 h erforderlich.

Bei Belichtung einer CAP-Lösung scheinen diese Prozesse offenbar entweder schneller abzulaufen, oder es treten noch andere Abbauprodukte auf, die auf die darin kultivierten Organismen toxisch wirken. Die Lösung wird gelb und zeigt eine veränderte Absorption mit einem Maximum bei 400 nm (ISHIURA und IWASA, 1973b; RAHAT et al., 1979). Nach Algenkultivierung in Gegenwart von CAP konnten außer den beiden bereits erwähnten Hydrolyseprodukten zusätzlich nachgewiesen werden 2-Amino-1-(4-aminophenyl)-propan-1,3-diol, p-Aminobenzoessäure, p-Aminobenzaldehyd und Ethanolamin (CZYGAN,

1964c; BUFF und ARNOLD, 1971). Dabei kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß eines oder mehrere dieser Produkte erst durch Wechselwirkungen mit dem Algenstoffwechsel entstanden sind bzw. Umbauprodukte anderer, primär gebildeter Stoffe darstellen. Auch die Frage, welches dieser Produkte letztendlich die Toxizität ausmacht oder ob sie im Zusammenspiel mehrerer Faktoren zu suchen ist, kann nicht beantwortet werden. Das cytotoxische Zersetzungsprodukt bzw. die Produkte sollten daher nach RAHAT et al. (1979) mit "ICAP" bezeichnet werden.

Ausgehend von der Beobachtung, daß während einer Gametogenese in Dunkelheit und Kälte keine lichtmikroskopisch feststellbare Zellveränderung auftritt und somit der Bezug zu einer echten Kontrolle gewahrt bleibt, und da CAP eine Induktion unter diesen Bedingungen nicht unterdrückt (ISHIURA und IWASA, 1973b), war es zur Ausschaltung einer möglichen Beeinflussung der mitochondriellen Morphologie durch ICAP statt durch CAP angebracht, auch Dunkel-Kälte-Induktionen mit CAP durchzuführen. Soweit die Angaben über eine niedrigere Proteinsyntheseaktivität aufgrund von Ribosomenverlusten in den Chloroplasten von Gameten (HONEYCUTT und MARGULIES, 1972; LEFEBVRE et al., 1978) überhaupt auf die Mitochondrien übertragbar sind und dann auch für dunkelinduzierte Gameten gelten, könnte dies durch den in Gegenwart von CAP erhöhten Prozentsatz von Polysomen (HOOBER und BLOBEL, 1969) im Vergleich zu den als Monosomen vorliegenden Ribosomen vielleicht u. U. wieder wettgemacht werden.

In Vorversuchen mit Zellstadien aus $t = 0$ und verschiedenen CAP-Konzentrationen wurden daher das lichtmikroskopisch überprüfbare Aussehen, die Zellbeweglichkeit und die Paarbildungsrate im Vergleich zu unbehandelten Kulturen untersucht. Das lichtmikroskopische Aussehen der behandelten Zellen entsprach nach 20 h praktisch noch dem der Kontrollzellen, wäh-

rend nach 60 h doch schon deutliche Pigmentverschiebungen festzustellen waren; jedoch bewegten sich auch nach dieser Zeit fast alle Zellen normal und entsprachen noch in etwa der Kontrolle. Die Paarbildungsrate lag allerdings etwas unter dem Wert, der für die Kontrollzellen ermittelt wurde.

IV. ERGEBNISSE

1. DIE MORPHOLOGIE DER MITOCHONDRIEN IN

VERSCHIEDENEN STADIEN DES ZELLZYKLUS

a) Vegetatives Stadium $t = 0$ (Zellen bei Lichtbeginn)

Wie Einzelschnitte von vegetativen Zellstadien bei $t = 0$ zeigen, sind Mitochondrienanschnitte in peripheren Zellregionen ebenso zu finden wie in zentralen Bereichen (Abb. 8, 9). Von dort können sie sich durch Chloroplastenperforationen nach außen erstrecken (Abb. 9). Häufig sind sie auch in der Nähe der Geißelbasis anzutreffen.

Dreidimensionale Rekonstruktionen ergeben, daß die Mitochondrien hauptsächlich außerhalb des Chloroplastenbechers und apikal in der Nähe der Geißelbasis auftreten (Abb. 2). Der Mitochondrienbestand in Zellen bei $t = 0$ entspricht dabei von den Formen her in etwa dem von ausdifferenzierten Tochterzellen innerhalb des Sporangiums (OSAFUNE et al., 1976). Neben kleinen, ovoiden Gebilden treten vor allem länglich-gewundene Mitochondrien auf, die allerdings nicht sehr hohen Verzweigungsgrad zeigen (Abb. 10). Auch die Zahl der Mitochondrien in einer Zelle kann variieren: In zwei Zellen desselben Entwicklungsstadiums bei $t = 0$ wurden 5 bzw. 11 Mitochondrien gefunden. Das Volumen des gesamten Chondrioms bleibt dabei relativ konstant, in der Zelle mit 5 Mitochondrien werden nur weniger kleinere Gebilde, dafür aber höherer Verzweigungsgrad angetroffen als in der Zelle mit 11 Mitochondrien. Die Zahl der Lobuli, die als mitochondrielle Untereinheiten erkennbar sind (vergl. II 2 c, V 1 a), beträgt für das gesamte Chondriom der beiden Zellen 56 bzw. 58; in Einzelmitochondrien der beiden Zellen wurden zwischen 1 und 25 Lobuli pro Mitochondrium gezählt.



Abb. 8: *Chlamydomonas reinhardtii* bei $t = 0$, etwas schräg getroffener Längsschnitt: Mitochondrienanschnitte (M) sind in der Nähe der Geißelbasis (GB) und der Kontraktilen Vakuole (KV) anzutreffen, außerdem zwischen Plasmalemma (Pl) und Chloroplast (Cp), der relativ viel Stärke (St) führt; der Kern (K) liegt ziemlich zentral; Restkörper (RK) mit ausgeschleustem Zellmaterial sind in diesem Zellstadium sehr selten

23 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten des in Abb. 10 dargestellten Modells ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $0,93 \pm 0,53$ bzw. $0,10 \pm 0,05 \mu\text{m}$, während die Volumina der Einzelmitochondrien in den beiden

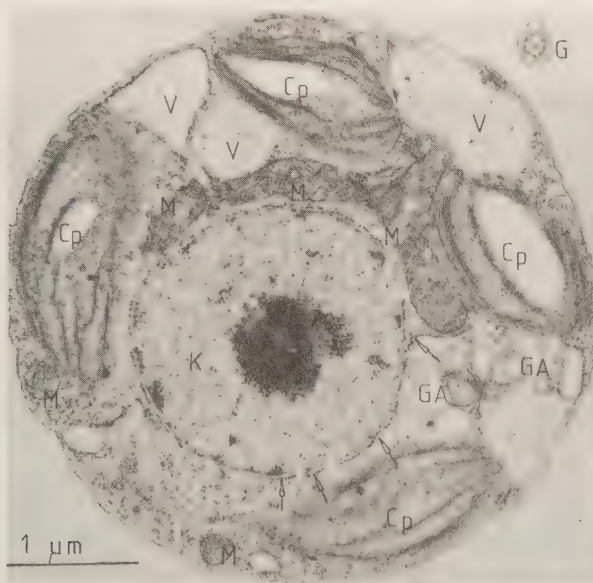


Abb. 9: *Chlamydomonas reinhardtii* bei $t = 0$, Querschnitt etwa in Höhe der Kernmitte: Mitochondrien (M) sind sowohl in der Nähe des Kerns (K) als auch in äußeren Zellregionen getroffen, der Chloroplast (Cp) zeigt hier vier getrennte Anschnitte; neben mehreren Vakuolen (V) sind zwei Golgi-Apparate (GA) gut zu erkennen, die Kernmembran zeigt starken Ribosomenbesatz (Pfeile); außerhalb der Zelle ist eine quergetroffene Geißel (G) zu sehen

Zellen zwischen $0,01$ und $0,91 \mu\text{m}^3$ variieren (Tab. 2). Die beiden Volumina des Chondrioms betragen $1,67$ und $1,96 \mu\text{m}^3$, entsprechend ca. 3 % des Zellvolumens innerhalb des Plasmalemmas oder etwa der Hälfte des Kernvolumens. 12 bzw. 13 elektronenoptisch Microbody-ähnliche Strukturen wurden in beiden Zellen gefunden, jeweils 6 davon in Mitochondrienassoziation. Die Gesamtvolumina dieser Microbody-Cytosomen

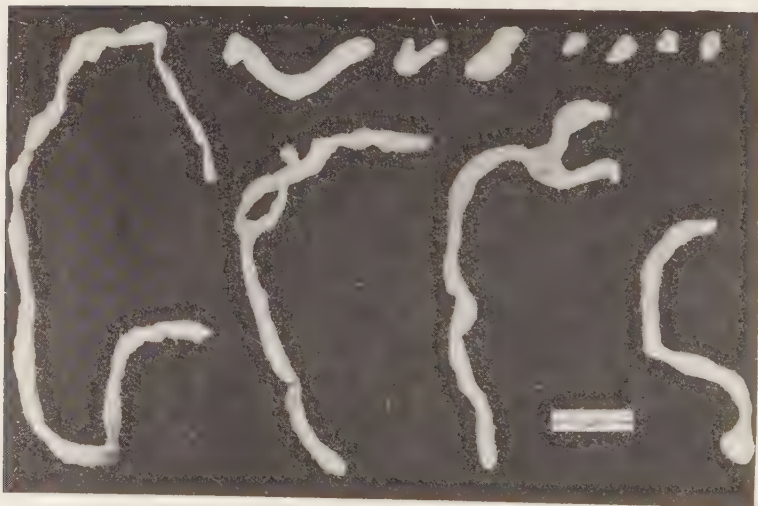


Abb. 10: Chondriom einer Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* bei $t = 0$, dreidimensionale Rekonstruktion der 11 Mitochondrien nach Auswertung von 60 Serienschnitten durch die Gesamtzelle (die räumliche Anordnung der Mitochondrien in bezug auf Chloroplast und Kern wurde in Abb. 2 dargestellt): Die aufgrund morphometrischer Auswertungen gefundenen Volumina sind in Tab. 2 aufgeführt (erste aufgelistete Zelle). 23 Messungen verschiedener Mitochondrienabschnitte ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $0,93 \pm 0,53$ bzw. $0,10 \pm 0,05 \mu\text{m}$

wurden zu 0,05 bzw. 0,07 μm^3 bestimmt. Für eine Zelle wurde auch das Chloroplastenvolumen berechnet; es beträgt mit 25,65 μm^3 etwa 40 % des Zellvolumens.

Tab. 2: Chlamydomonas reinhardtii bei $t = 0$, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischen Auswertungen von jeweils 60 Serienschnitten durch zwei Gesamtzellen

Volumina in μm^3	Zelle 1	Zelle 2
Zelle	64,36	61,94
Kern	3,56	4,09
Chondriom	1,67	1,96
Mitochondrien 1	0,01	0,02
2	0,01	0,05
3	0,01	0,43
4	0,02	0,55
5	0,03	0,91
6	0,07	--
7	0,13	--
8	0,21	--
9	0,25	--
10	0,35	--
11	0,58	--
Microbody-Cytosomen	0,07	0,05

b) Vegetatives Stadium $t = 6$ (Zellen der 6. Lichtstunde)

Die Untersuchungen zur 6. Lichtstunde des vegetativen Zyklus ergänzen die Ergebnisse von OSAFUNE et al. (1975c).

Die Mitochondrien liegen hier überwiegend in zentralen Zellbereichen. Sie erscheinen im Einzelschnittbild rundlicher als bei Lichtbeginn, die kurze Achse ist im Vergleich

zu $t = 0$ offenbar vergrößert (Abb. 11). Die Mitochondrienzahl ist dagegen angewachsen; in einer Zelle wurden 43 Mitochondrien gezählt. Die Zahl der als mitochondrielle Unter-einheiten erkennbaren Lobuli hat sich andererseits nur geringfügig auf 79 erhöht. In Übereinstimmung damit sinkt die

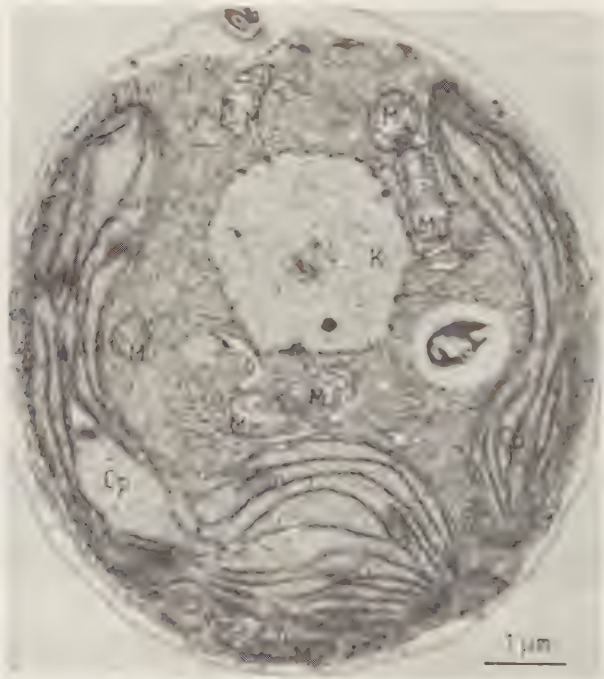


Abb. 11: *Chlamydomonas reinhardtii* bei $t = 6$, etwas schräg getroffener Längsschnitt: Mitochondrien (M) liegen vor allem im Zentrum der Zelle zwischen Chloroplast (Cp, zwei Anschnitte) und Kern (K) sowie apikal in Geißelnähe (G), seltener außerhalb des Chloroplasten

Tab. 3: Chlamydomonas reinhardii bei $t = 6$, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischer Auswertung von 97 Serienschritten durch eine Gesamtzelle

Volumina in μm^3		Zelle bei $t = 6$
Zelle		217,32
Kern		9,58
Chondriom		5,36
Mitochondrien	1	0,02
	2	0,03
	3	0,05
	4	0,05
	5	0,05
	6	0,06
	7	0,06
	8	0,06
	9	0,07
	10	0,07
	11	0,07
	12	0,07
	13	0,08
	14	0,08
	15	0,08
	16	0,08
	17	0,09
	18	0,09
	19	0,10
	20	0,10
	21	0,11
	22	0,12
	23	0,12
	24	0,12
	25	0,13
	26	0,13
	27	0,13
	28	0,13
	29	0,13
	30	0,14
	31	0,14
	32	0,14
	33	0,14
	34	0,16
	35	0,16
	36	0,17
	37	0,19
	38	0,19
	39	0,21
	40	0,25
	41	0,28
	42	0,29
	43	0,42
Microbody-Cytosomen		0,05

Zahl der Lobuli pro Mitochondrium auf 1 bis 8 ab. Dies entspricht einer Zunahme der kugelig-ovoiden Formen (23 Mitochondrien) und einer Abnahme des Verzweigungsgrades bei den anderen, eher länglich-gestreckten Mitochondrien.

Die Volumina der Einzelmitochondrien variieren zwischen $0,02$ und $0,42 \mu\text{m}^3$ (Tab. 3). Das Chondriom ist in der Zeit zwischen $t = 0$ und $t = 6$ auf das etwa 3fache angewachsen, während sich das Zellvolumen auf den 3,5fachen, das Kernvolumen nur auf den 2,5fachen Wert erhöht hat. Das Volumen der Microbody-Cytosomen ist dagegen mit $0,05 \mu\text{m}^3$ praktisch gleichgeblieben, allerdings wurden nur 3 von 9 Microbody-Cytosomen in Mitochondriennähe gefunden.

c) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 9 + 20 \text{ h}$
(20stündige Induktion von Zellen der 9. Lichtstunde)

Für das intermediäre Wachstumsstadium zur 9. Lichtstunde des vegetativen Zyklus wurden von OSAFUNE et al. (1975c) Riesenmitochondrien beschrieben, die durch Fusion kleinerer Mitochondrieneinheiten zu höher verzweigten Formen gebildet werden.

Ausgehend von dem vegetativen Zellzyklusstadium $t = 9$ wurde eine 20stündige Gameteninduktion in Dunkelheit und Kälte durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Morphologie der Mitochondrien offenbar ebenso wie die äußere Morphologie der Zellen praktisch unverändert bleibt in bezug auf das Ausgangsstadium bei $t = 9$. Die Mitochondrien zeigen schon im Einzelschnitt große Formenvielfalt und in der Regel hohen Verzweigungsgrad; sie liegen überwiegend im Zentrum der Zelle oder im Bereich der Kontraktilen Vakuole und bisweilen so nah aneinander, daß die Unterscheidung zwischen Assoziationen und echten Fusionen schwer fällt (Abb. 12, 13, 14, 15).

Vermutlich aufgrund des 20stündigen Verweilens im Dunkeln ist es zu einem Pigmentverlust des Augenflecks gekommen - der wabenartige Aufbau des Stigmas aus Sechsecken wird dadurch gut sichtbar (Abb. 16).

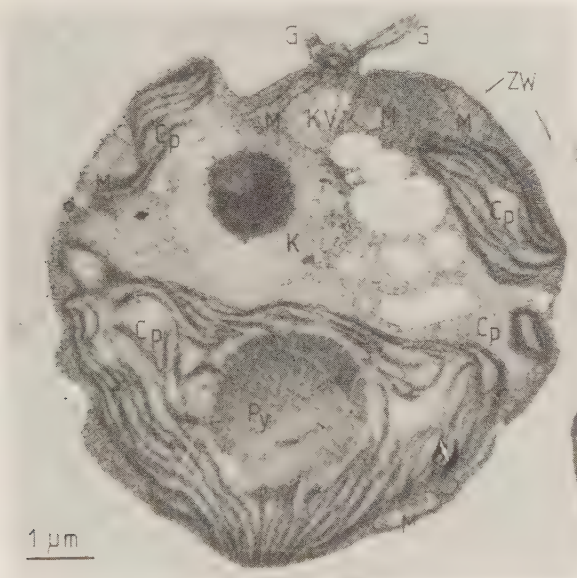


Abb. 12: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, Medianschnitt: Mitochondrienanschnitte (M) sind in der Nähe der Ansatzstelle der Geißeln (G) getroffen, liegen aber auch außerhalb des Chloroplasten (Cp), der vier getrennte Anschnitte zeigt; das Pyrenoid (Py) ist auffallend groß, Stärke praktisch nicht vorhanden; der Kern (K) liegt nicht zentral, sondern seitlich verschoben; die Zelle hat ihre Zellwand (ZW) nicht abgeworfen, sich aber stark zurückgezogen



Abb. 13: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, Schrägschnitt: Mitochondrienanschnitte (M) sind überwiegend im Zellzentrum zu finden, wo sie bisweilen so nah aneinanderliegen, daß es schwierig ist, enge Assoziationen und echte Fusionsstellen klar zu unterscheiden (Pfeile); ringförmige Mitochondrien treten ebenso auf wie handtelförmige Strukturen (Doppelpfeil), die vermutlich Teilungsstadien darstellen; der Chloroplast (Cp) ist in drei Anschnitten getroffen, das Pyrenoid (Py) offenbar nicht so groß wie in Abb. 12; Stärke (St) ist vorhanden; der Kern (K) ist am Rande getroffen; diese Zelle besitzt keine Zellwand mehr, was als gametenspezifisches Merkmal gedeutet werden kann

Dreidimensionale Rekonstruktionen zeigen, daß neben ovoiden Formen länglich-verzweigte Mitochondrien vorliegen, die überaus vielgestaltig sein können; es treten wurm-, hantel-, schleifen-, rauten-, diskus-, hufeisen- sowie Y- oder Z-förmige Mitochondrien und noch viele weitere Variationen dieser Formen auf. Diese kleineren Einheiten können auch zu hochverzweigten Riesenmitochondrien fusioniert sein.



Abb. 14: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, Querschnitt etwa durch die Mitte des Kerns: Mitochondrien (M) liegen überwiegend zentral zwischen Kern (K) und Chloroplast (Cp), der in acht Anschnitten getroffen ist; zwei Dictyosomen (Golgi-Apparat, GA) sind sichtbar; wie in Abb. 13 besitzt auch diese Zelle keine Zellwand mehr

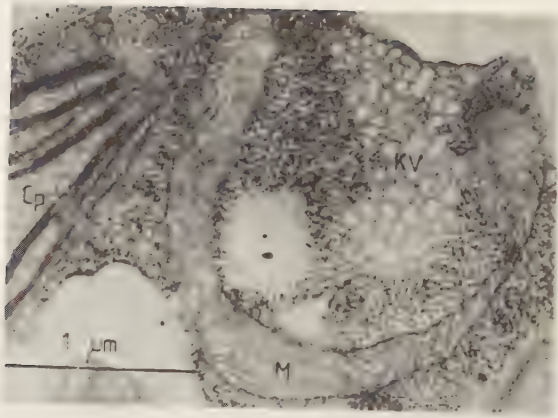


Abb. 15: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, Ausschnitt aus dem apikalen Zellteil: Ein hufeisenförmiger Mitochondrienanschnitt (M), der am Chloroplasten (Cp) anliegt, umschließt zuführende Kanälchen der Kontraktilen Vakuole (KV)

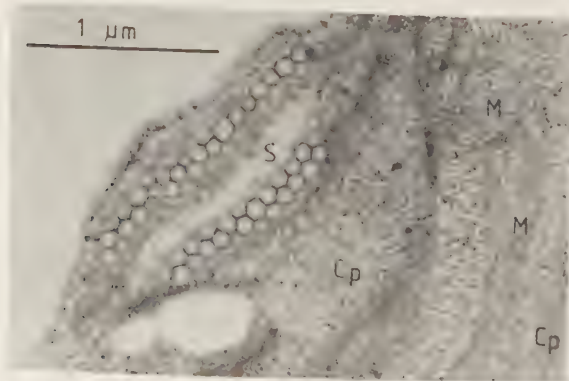


Abb. 16: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, Ausschnitt vom Chloroplasten in der Gegend des Augenflecks: Das Stigma (S) ist nicht mit Pigment erfüllt, der wabenartige Aufbau daher deutlich zu erkennen; im rechten Teil des Bildes sind zwei zwischen Chloroplastenanschnitten (Cp) liegende Mitochondrienanschnitte (M) sichtbar

In einer Zelle wurde ein Mitochondriennetz gefunden, das als aus drei oder vier Riesenmitochondrien (Netzwerkbruchstücken) zusammengesetzt vorstellbar wäre (Abb. 17). Dieses Netzwerk liegt im Zentrum der Zelle, entsendet aber einige Ausläufer durch Chloroplastenperforationen nach außen.



Abb. 17: Chondriom einer Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, dreidimensionale Rekonstruktion der 24 Mitochondrien (1 Netzwerk und 23 Einzelmitochondrien) nach Auswertung von 100 Serienschnitten durch die Gesamtzelle: Die Formen sind insgesamt sehr unterschiedlich; neben dem großen, netzförmig verzweigten Mitochondrium treten auch winzige (obere Reihe), kleine (mittlere Reihe) und mittlere (untere Reihe) Einzelmitochondrien auf. Die aufgrund morphometrischer Auswertungen gefundenen Volumina sind in Tab. 4 aufgeführt (zweite aufgelistete Zelle). 40 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $1,09 \pm 0,50$ bzw. $0,10 \pm 0,02 \mu\text{m}$

Tab. 4: Chlamydomonas reinhardtii nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischen Auswertungen von 76, 90 und 100 Serienschnitten durch drei Gesamtzellen

Volumina in μm^3	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3
Zelle	243,30	185,43	163,64
Kern	9,70	8,63	8,38
Chondriom	7,48	5,59	4,47
Mitochondrien			
1	0,07	0,01	0,11
2	0,13	0,02	0,19
3	0,13	0,02	0,33
4	0,14	0,02	0,50
5	0,14	0,02	0,50
6	0,18	0,02	0,54
7	0,18	0,02	0,97
8	0,20	0,02	1,33
9	0,25	0,02	--
10	0,29	0,03	--
11	0,30	0,04	--
12	0,40	0,05	--
13	0,41	0,05	--
14	0,48	0,06	--
15	0,48	0,07	--
16	0,57	0,08	--
17	0,71	0,08	--
18	0,83	0,10	--
19	1,59	0,10	--
20	--	0,12	--
21	--	0,12	--
22	--	0,13	--
23	--	0,17	--
24	--	4,22	--
Microbody-Cytosomen	0,16	0,04	0,16

Die Zahl der Mitochondrien, die in einer Zelle vorhanden sein können, ist entsprechend den Möglichkeiten unterschiedlicher Formnehmung nicht konstant; offenbar sind in diesem

Zellstadium die Fusions- und Zerteilungsprozesse von Mitochondrien sehr dynamisch. In zwei untersuchten Zellen wurden 8 und 19 Mitochondrien gezählt, in einer dritten sind neben 1 Mitochondriennetzwerk zusätzlich 23 Einzelmitochondrien vorhanden, insgesamt also 24 Mitochondrien. Die Zahl der unterscheidbaren Lobuli beträgt für das jeweilige Chondriom der drei Zellen 30, 47 und 144; in Einzelmitochondrien wurden zwischen 1 und 6 Lobuli pro Mitochondrium gezählt, für das Netzwerk 90 Lobuli. Die Lobuli sind demnach nicht als starre Untereinheiten aufzufassen, sondern unterliegen offenbar derselben Morphodynamik wie das Chondriom selbst. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß der Entwicklungszustand der drei ausgewerteten Zellen - obwohl synchronisierten Kulturen entnommen - sicher nicht der gleiche ist, worauf auch die unterschiedlichen Gesamtvolumina der drei Zellen hinweisen (Tab. 4).

40 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten des in Abb. 17 dargestellten Modells ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $1,09 \pm 0,50$ bzw. $0,10 \pm 0,02 \mu\text{m}$. Diese Werte entsprechen in etwa denen in Zellen bei $t = 0$. Die Volumina der Mitochondrien in den drei ausgewerteten Zellen bei $t = 9 + 20 \text{ h}$ (Tab. 4) variieren zwischen $0,01$ bis $0,11 \mu\text{m}^3$ (für die kleinsten Mitochondrieneinheiten in jeweils einer Zelle) und $1,33$ bis $1,59 \mu\text{m}^3$ (für die größten Riesenmitochondrien in einer Zelle) bzw. bis $4,22 \mu\text{m}^3$ (für das Mitochondriennetz). Die Werte für das Gesamtchondriom der drei Zellen schwanken, vermutlich in Abhängigkeit von der erreichten Zellgröße, zwischen $4,47$ und $7,48 \mu\text{m}^3$ und erreichen damit wieder ca. 3 % des Zellvolumens innerhalb des Plasmalemmas oder gut die Hälfte des Kernvolumens. Das Volumen der Microbody-ähnlichen Cytosomen beträgt für die Zelle mit dem Netzwerk $0,04 \mu\text{m}^3$ (7 Microbody-Cytosomen frei, 5 mitochondrienassoziiert), für die beiden anderen Zellen jeweils $0,16 \mu\text{m}^3$ (in einem Verhältnis von 3:3).

d) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 0 + 20 \text{ h}$

(20stündige Induktion von Zellen bei Lichtbeginn)

Wenn man vom vegetativen Zellstadium $t = 0$ ausgeht, so entspricht die Morphologie der Mitochondrien nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese nicht mehr dem Bild des Ausgangsstadiums, obwohl sich die äußere Morphologie der Zellen nicht verändert hat. Die Mitochondrienanschnitte erscheinen im Einzelbild verbreitert; beim Durchmustern einer Zelle fällt auf, daß relativ wenige Mitochondrienanschnitte pro Zellanschnitt vorhanden sind. Die Lage der Mitochondrien ist dagegen offenbar gleichgeblieben (Abb. 18, 19).

Aufgrund der geringen Zahl von Mitochondrienanschnitten pro Zellanschnitt war es beim Vorliegen von Schnittbändern teilweise möglich, die Zahl der Mitochondrien pro Zelle bereits bei der elektronenmikroskopischen Durchsicht der Zellen zu bestimmen; es mußten daher nur bei drei von sechs durchgezählten Zellserien Rekonstruktionen durchgeführt werden. Dabei fiel auf, daß die Zahl der in einer Zelle vorhandenen Mitochondrien etwas zurückgegangen ist. In den sechs Zellen wurden jeweils zweimal nur 4, 5 und 7 Mitochondrien gezählt.

Um eine evtl. Veränderung im Mitochondrienbestand nach längerer Induktionszeit ausschließen zu können, wurden zwei Zellen auch nach 60stündiger Gametogenese unter diesen Bedingungen untersucht. In diesen Zellen waren 6 bzw. 9 Mitochondrien vorhanden, also ebenfalls eine Abnahme in bezug auf das Ausgangsstadium bei $t = 0$ festzustellen. Die Zellen zeigten jedoch eine relativ starke Vakuolisierung. Auf die weitere Auswertung dieser Zellen wurde daher verzichtet.

Die Zahl der unterscheidbaren Lobuli in drei nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese rekonstruierten Zellen beträgt für das jeweilige Chondriom der drei Zellen 13, 18 und 25, die Werte für Einzelmitochondrien variieren zwischen



Abb. 18: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h, medianer Längsschnitt: Mitochondrienanschnitte (M) sind an der Geißelbasis (GB) getroffen; der Kern (K) liegt zentral in der oberen Zelhälfte und wird vom Chloroplasten (Cp) mit zwei Anschnitten überragt; im Chloroplastenknä ist ein Microbody-ähnliches Cytosom (MBC) getroffen

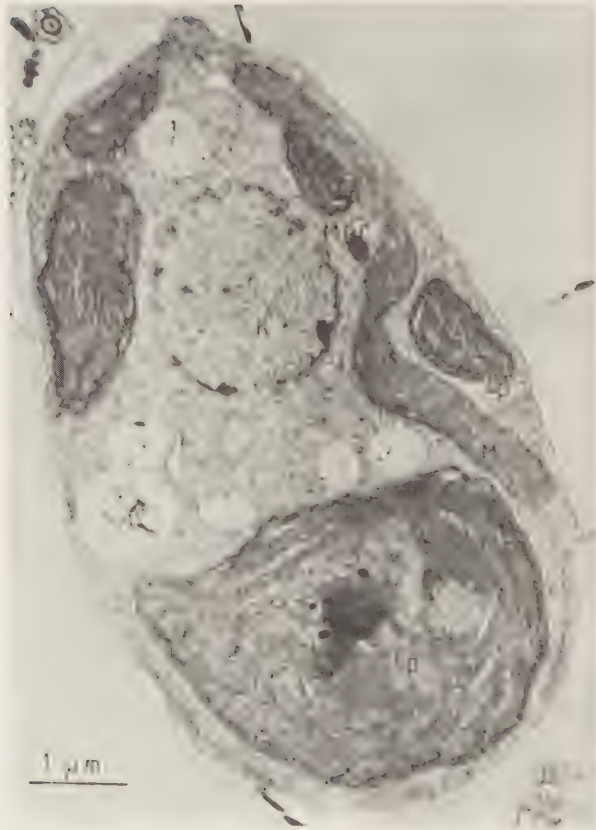


Abb. 19: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gameto-
genese bei $t = 0 + 20$ h, sagittal getroffener
Längsschnitt: Mitochondrienanschnitte (M) winden
sich teilweise als lange und relativ breite Bänder
mäanderartig durch Chloroplastenperforationen (Cp,
vier Anschnitte), ein Microbody-ähnliches Cytosom
(MBC) liegt in der Nähe des Mitochondriums neben
dem Kern (K)

1 und 8. Diese Abnahme der Zahl der Lobuli im Vergleich zum Ausgangsstadium bei Lichtbeginn ist vermutlich dadurch zu erklären, daß sie infolge leichter lobulärer Vergrößerung weniger unterscheidbar geworden sind.

In der Tat zeigen die an 12 verschiedenen Mitochondrien-segmenten eines Modells (Abb. 20) durchgeführten Messungen eine leichte, etwa 1,5fache Verlängerung der langen Achsen auf $1,51 \pm 0,48 \mu\text{m}$ bzw. sogar eine etwas stärkere, etwa 2,5fache Verbreiterung der kurzen Achsen auf $0,25 \pm 0,10 \mu\text{m}$. Die Volumina der Einzelmitochondrien schwanken zwischen $0,05$ bis $0,21 \mu\text{m}^3$ (für die kleinsten Mitochondrieneinheiten einer Zelle) und $0,78$ bis $1,42 \mu\text{m}^3$ (für die größten Mitochondrien einer Zelle); ganz kleine Mitochondrien wie in

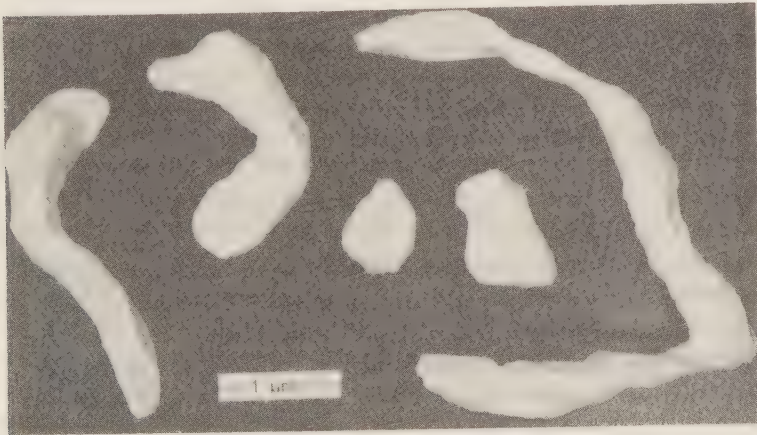


Abb. 20: Chondriom einer Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20 \text{ h}$, Modell der 5 Mitochondrien nach Auswertung von 77 lückenlosen Serienschritten der ganzen Zelle: Die Volumina der Mitochondrien sind in Tab. 5 aufgeführt (zweite aufgelistete Zelle). 12 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $1,51 \pm 0,48$ bzw. $0,25 \pm 0,10 \mu\text{m}$

Tab. 5: Chlamydomonas reinhardtii nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischen Auswertungen von 77 bzw. 86 Serienschritten durch zwei Gesamtzellen und 40 Serienschritten durch eine Teilzelle (hierbei vom Auftreten des ersten bis zum Verschwinden des letzten Mitochondrienanschnitts)

Volumina in μm^3		Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3
Zelle		86,04	85,56	??
Kern		5,59	5,48	4,40
Chondriom		3,18	3,00	2,20
Mitochondrien	1	0,21	0,16	0,05
	2	0,23	0,27	0,49
	3	0,25	0,56	0,69
	4	0,38	0,59	0,97
	5	0,59	1,42	--
	6	0,74	--	--
	7	0,78	--	--
Microbody-Cytosomen		0,09	0,07	??

den bisher beschriebenen Stadien existieren also nicht (Tab. 5). Die jeweiligen Volumina des gesamten Chondrioms in den drei morphometrisch ausgewerteten Zellen liegen trotz geringerer Mitochondrienzahl etwas höher als in den vergleichbaren Zellen des vegetativen Zellstadiums $t = 0$; bei Bezug auf das Zellvolumen errechnet sich ein Anteil von ca. 3,5 % (im Vergleich zu nur etwa 3 % bei $t = 0$). Die Relation zum Kernvolumen bleibt in etwa gewahrt; auch die Relation von freien zu assoziierten, also in Mitochondriennähe liegenden Microbody-ähnlichen Cytosomen, sowie ihre Volumina entsprechen praktisch dem Ausgangsstadium von $t = 0$ bei Lichtbeginn. Die Volumina der Microbody-Cytosomen betragen in zwei vollständig ausgewerteten Zellen 0,07 bzw. 0,09 μm^3 bei einer Relation von freien zu assoziierten Körpern von 4:5 bzw. 7:6.

2. DIE MORPHOLOGIE DER MITOCHONDRIEN IN GEGENWART VON CHLORAMPHENICOL

a) Vegetatives Stadium $t = 0 + 6 \text{ h CAP}$ (6stündige Behandlung von Zellen bei Lichtbeginn)

Ausgehend vom Zellstadium bei Lichtbeginn wurden Zellen einer vegetativen Kultur von *Chlamydomonas reinhardtii* während der ersten sechs Lichtstunden eines synchronisierenden Hell-Dunkel-Rhythmus mit CAP (2 mg/cm^3) behandelt. Eine unmittelbar vor der Einbettung durchgeführte lichtmikroskopische Überprüfung der Zellen ergab keinen merkbaren Unterschied in der Beweglichkeit gegenüber den Kontrollzellen; die behandelten Zellen waren andererseits aber auch nicht herangewachsen, sondern offenbar auf dem Größenstadium der Zellen bei $t = 0$ stehengeblieben.

Die nach dieser Zeit am Einzelschnitt feststellbaren Unterschiede zur Kontrolle sind dagegen recht erheblich (Abb. 21, 22, 23). Die Mitochondrien zeigen meist stärkere Kontrastierung der Matrix, sind oft aber auch verbreitert und besitzen dann nur am Rand Cristae und Matrixstrukturen, während der Innenraum völlig elektronenleer ist. Diese matrixfreien Bereiche stellen häufig Zentren von Aufblähungen dar. Mitunter werden auch in Mitochondrien eingeschlossene Myelinfiguren sichtbar (Abb. 24). Microbody-ähnliche Cytosomen sind in der Regel fast ausschließlich an Mitochondrien assoziiert (Abb. 24, 25).

Werden andere Zellstrukturen in die Betrachtung einbezogen, so fällt auf, daß der Chloroplast - abgesehen von einer leicht gestörten Anordnung und möglicherweise geringeren Anzahl der Thylakoide - relativ unverändert erscheint; dagegen kommt es teilweise zu einer lokalen Auflösung der Kernmembran und stärkeren Vakuolisierung des Cytoplasmas. Auch eine erhöhte Aktivität der Dictyosomen wird aufgrund vermehrt ge-



Abb. 21: *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 6 \text{ h CAP}$, etwas schräg getroffener Längsschnitt: Die Lage der Mitochondrien (M) entspricht in etwa der bei $t = 0$; sie sind jedoch im Vergleich zur Kontrolle vergrößert und zeigen nur am Rand Cristae und Matrixstrukturen, während der Innenraum elektronenleer ist; die Thylakoide im Chloroplasten (Cp, zwei Anschnitte) erscheinen verdünnt, die allgemeine Anordnung etwas gestört; im Zellanschnitt sind drei große Vakuolen (V) getroffen; der Kern (K) erscheint unverändert

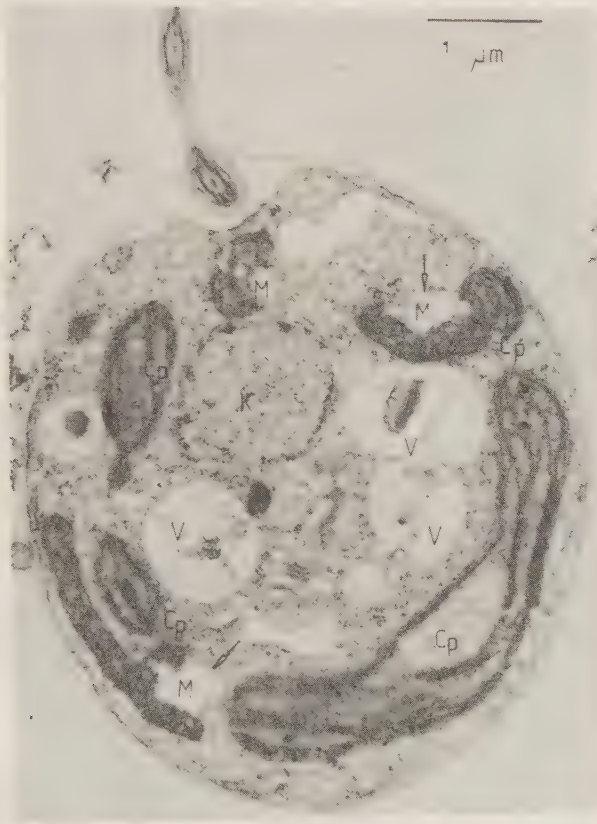


Abb. 22: *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 6 \text{ h CAP}$, schräg getroffener Längsschnitt: Die Mitochondrien (M) zeigen stärkere Kontrastierung der Matrix als in der Kontrolle, sind aber andererseits in bestimmten Regionen elektronenleer; diese Bezirke erscheinen teilweise stark aufgebläht (Pfeile); drei größere Vakuolen (V) liegen im Zentrum der Zelle innerhalb des Chloroplasten (Cp), der vier Anschnitte zeigt

bildeter Golgi-Vesikel vermutet. Inwieweit diese Veränderungen aber direkt mit einer Schädigung aufgrund des zugegebenen Antibiotikums korrelieren oder ob es sich dabei um Sekundäreffekte handelt, bleibt ungewiß.

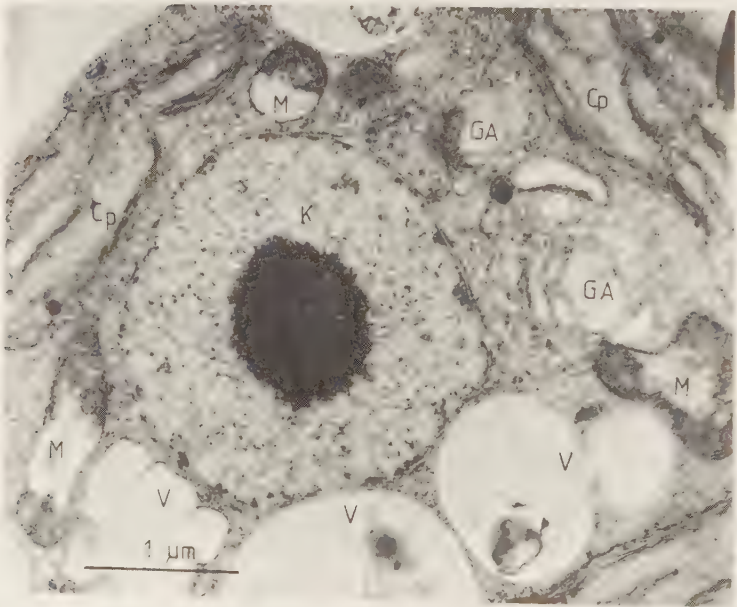


Abb. 23: *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 6$ h CAP, Ausschnitt aus einem Querschnitt: Die um den Kern (K) innerhalb des Chloroplasten (Cp, drei Anschnitte) gruppierten Mitochondrien (M) zeigen sehr dichte Kontrastierung der Matrix, sind dagegen an anderen Stellen elektronenleer; in der gleichen Region der Zelle sind drei Vakuolen (V) und zwei Dictyosomen (Golgi-Apparat, GA) getroffen

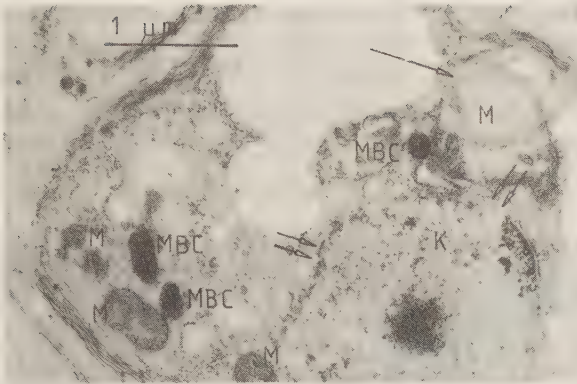


Abb. 24: *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 6$ h CAP, Ausschnitt aus einem Querschnitt: Die Mitochondrien (M) im Bild links unten sind klein und elektronendicht; ein anderes, stark vergrößertes Mitochondrium liegt rechts oben im Bild; es zeigt nur mehr wenig Matrix, enthält aber eine Myelinfigur (Pfeil); Microbody-Cytosomen (MBC) sind mit den Mitochondrien assoziiert; die Kernmembran erscheint teilweise aufgelöst (K, Doppelpfeile)

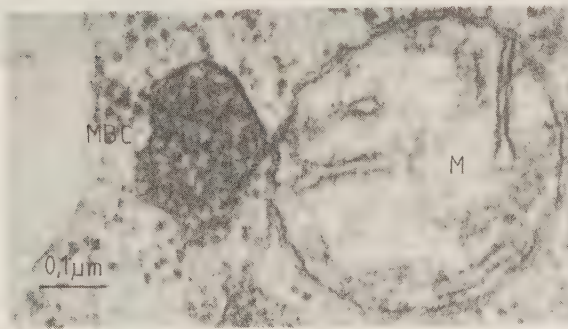


Abb. 25: *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 6$ h CAP, starke Vergrößerung der Assoziation eines Microbody-Cytosoms (MBC) mit einem Mitochondrium (M)

Anhand dreidimensionaler Rekonstruktionen ist zu erkennen, daß die Formen der Mitochondrien in bezug auf das Ausgangsstadium bei $t = 0$ (Kontrolle) im Prinzip gleichgeblieben sind und im wesentlichen nur durch die bereits erwähnten lokalen Aufblähungen davon abweichen (Abb. 26). In zwei untersuchten Zellserien wurden 11 bzw. 12 Mitochondrien ge-

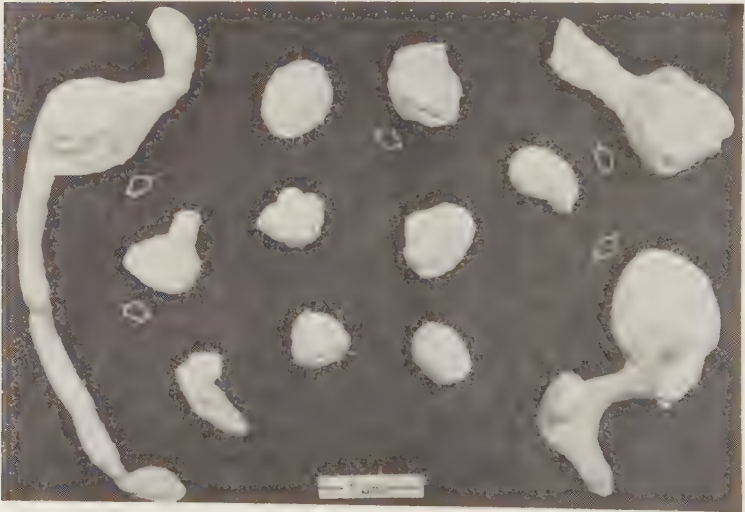


Abb. 26: Chondriom einer Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 6$ h CAP, dreidimensionale Rekonstruktion der 12 Mitochondrien nach Auswertung von 70 Serienschritten durch die Gesamtzelle: Die Formen entsprechen in etwa denen bei $t = 0$ (vergl. das Modell in Abb. 10), doch sind die Mitochondrien in bestimmten Regionen lokal aufgebläht (Pfeile), während andere Bezirke unverändert wirken. Die aufgrund morphometrischer Auswertungen gefundenen Volumina sind in Tab. 6 aufgeführt (erste aufgelistete Zelle). 23 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $0,90 \pm 0,42$ bzw. $0,40 \pm 0,24 \mu\text{m}$, zeigen also eine große Variationsbreite

Tab. 6: Chlamydomonas reinhardtii im vegetativen Zyklus mit CAP bei t = 0 + 6 h CAP, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischen Auswertungen von 60 bzw. 70 Serienschnitten durch zwei Gesamtzellen

Volumina in μm^3		Zelle 1	Zelle 2
Zelle		67,98	61,31
Kern		4,36	4,88
Chondriom		3,01	2,46
Mitochondrien	1	0,06	0,03
	2	0,07	0,03
	3	0,08	0,04
	4	0,08	0,09
	5	0,09	0,14
	6	0,14	0,16
	7	0,14	0,28
	8	0,17	0,28
	9	0,25	0,29
	10	0,49	0,35
	11	0,67	0,77
	12	0,77	--
Microbody-Cytosomen		0,12	0,08

funden. Da nur wenige Mitochondrien langgestreckt sind, viele aber klein und ovoid, liegt auch ihre Anzahl pro Zelle bei der der Kontrolle. Die Zahl der Lobuli schwankt etwa wie in der Kontrolle von 1 bis 20, doch ist die Zahl dieser noch feststellbaren Untereinheiten für die beiden Zellen insgesamt sehr unterschiedlich (33 bzw. 70). Offenbar sind an den Mitochondrien mit lokalen Anschwellungen weniger Substrukturen zu unterscheiden; die Aufblähungen selbst stellen stark erweiterte Lobuli dar. Wie die an 23 verschiedenen Mitochondrienabschnitten eines Modells (Abb. 26) durchgeführten Messungen der langen und kurzen Achsen zeigen, ergibt sich bei

einem allerdings sehr großen Varianzbereich eine etwa 4fache Verbreiterung der kurzen Achsen im Vergleich zur Kontrolle auf $0,40 \pm 0,24 \mu\text{m}$, während die langen Achsen mit $0,90 \pm 0,42 \mu\text{m}$ praktisch keine Veränderung zeigen.

Die Volumina der Einzelmitochondrien in zwei morphometrisch ausgewerteten Zellen schwanken zwischen $0,03$ und $0,77 \mu\text{m}^3$, ganz kleine Mitochondrien existieren also nicht (Tab. 6). Im Vergleich zur Kontrolle ist das Volumen des Gesamtchondrioms etwa 1,5fach angewachsen, die 50%-Relation zum Kern wird trotz dessen ebenfalls feststellbarer Volumenvergrößerung überschritten. Das Volumen des Chloroplasten ist dagegen gleichgeblieben, ebenso auch die Zellvolumina; die Zellen sind in der Tat nicht gewachsen, sondern durch CAP offenbar echt arretiert worden. Dagegen hat sich das Volumen der Microbody-Cytosomen erhöht; die krasse Veränderung ihrer Relation von freien zu mitochondrienassoziierten Strukturen auf 1:6 bzw. 3:8 (zum Vergleich: 6:6 bzw. 7:6 in der Kontrolle) bei nur geringfügigem Volumenzuwachs auf $0,08$ bzw. $0,12 \mu\text{m}^3$ wird später noch diskutiert.

b) Vegetatives Stadium $t = 0 + 12 \text{ h CAP}$

(12stündige Behandlung von Zellen bei Lichtbeginn)

Ein Teil der von Lichtbeginn des vegetativen Zyklus an mit CAP (2 mg/cm^3) behandelten Zellen wurde über die ersten sechs Stunden hinaus für weitere sechs Stunden im gleichen Medium belassen. Bei Entnahme der Kulturen zur 12. Lichtstunde bietet sich überraschenderweise nun ein völlig anderes Bild. Der Einzelschnitt (Abb. 27) zeigt zwar eine starke Vakuolisierung der Zelle und relativ große Microbody-Cytosomen in Assoziation mit Mitochondrien, doch erscheinen die Mitochondrien selbst ungeschädigt. Regionen, in denen wie bei $t = 0 + 6 \text{ h CAP}$ die

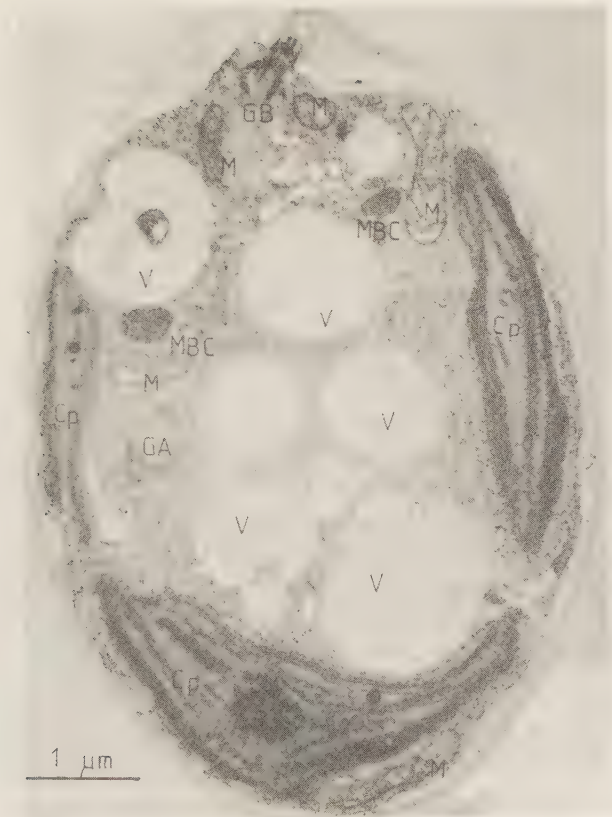


Abb. 27: *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 12$ h CAP, Längsschnitt: Die Lage der Mitochondrien (M) entspricht in etwa der bei $t = 0$ und bei $t = 0 + 6$ h CAP; sie befinden sich überwiegend in peripheren Zellregionen außerhalb des Chloroplasten (Cp, drei Anschnitte) sowie an der Geißelbasis (GB), zeigen aber keine offensichtlichen Anzeichen einer Schädigung; zwei große Microbody-Cytosomen (MBC) werden in Mitochondriennähe gefunden; im Zentrum der Zelle sind Golgi-Apparat (GA) und Vakuolen (V) getroffen

Matrix verdichtet oder aber völlig elektronenleer ist, sind nicht feststellbar. Die Lage der Mitochondrien entspricht andererseits noch weitgehend der bei $t = 0$ oder $t = 0 + 6$ h CAP.

Auch nach dreidimensionalen Rekonstruktionen sind Formanomalien wie bei $t = 0 + 6$ h CAP nur selten feststellbar. Eine Erklärung hierfür liefern vielleicht die relativ häufig anzutreffenden Teilungsstadien, die im zweidimensionalen Bild meist als hantelförmige Mitochondrien abgebildet werden (Abb. 13), während sie dreidimensional eher dünnen Wänden mit breiteren seitlichen Wülsten gleichen (Abb. 28). Dies suggeriert einen möglichen Reparaturmechanismus der Mitochondrien, wodurch lokal geschädigte Regionen wie beispielsweise die auf bestimmte Bezirke beschränkten Anschwellungen bei $t = 0 + 6$ h CAP abgeschnitten werden könnten. Mit diesen Einschränkungen entspricht der hier gefundene Mitochondrienbestand möglicherweise einem zwischen den vegetativen Stadien $t = 0$ und $t = 6$ liegenden intermediären Wachstumsstadium.

Die beiden Zellserien, die aus diesem Stadium $t = 0 + 12$ h CAP untersucht wurden, zeigen hinsichtlich des Reparaturmechanismus oder auch des früheren, durch CAP verursachten Schädigungsgrades offenbar einen verschiedenen Entwicklungszustand. Während in der einen Zelle nur 14 Mitochondrien gezählt wurden, sind es in der anderen 38. Hier sind bereits sehr viel mehr kleinere Einheiten vorhanden; auch die Zahl der Lobuli ist höher (pro Zelle 107 im Vergleich zu 69; pro Mitochondrium 1 bis 20 im Vergleich zu 2 bis 9). Diese Zelle ist vermutlich schon angewachsen; die Volumina von Zelle, Kern und Chondriom zeigen jedenfalls höhere Werte als die der kleineren Zelle. Die Volumenrelation des Chondrioms zum Zellvolumen liegt jedoch auch hier über den entsprechenden Werten von $t = 0$ oder $t = 6$, wenn auch schon unter denen bei $t = 0 + 6$ h CAP.

Messungen an 58 verschiedenen Mitochondriensegmenten des in Abb. 28 dargestellten Modells zeigen mit $0,75 \pm 0,34 \mu\text{m}$ für die langen Achsen und $0,16 \pm 0,09 \mu\text{m}$ für die kurzen Achsen ebenfalls einen deutlichen Trend zur Normalisierung der Mitochondrienquerschnitte (kurze Achsen zum Vergleich: $0,10 \pm 0,05 \mu\text{m}$ für $t = 0$; $0,40 \pm 0,24 \mu\text{m}$ bei $t = 0 + 6 \text{ h CAP}$).



Abb. 28: Chondriom einer Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus mit CAP bei $t = 0 + 12 \text{ h CAP}$, Modell der 38 Mitochondrien nach Auswertung von 87 Serienschritten durch die gesamte Zelle: Lokale Anschwellungen in bestimmten Mitochondrienregionen wie bei $t = 0 + 6 \text{ h CAP}$ (Abb. 26) sind nicht vorhanden; vielmehr werden neben kleineren Einheiten auch mitochondrielle Teilungsstadien mit dünnen Verbindungen zwischen den stärker verdickten Enden angetroffen (Pfeile), die im Einzelschnitt häufig als hantelförmige Strukturen abgebildet werden (Abb. 13, Doppelpfeil). Die aufgrund morphometrischer Auswertungen gefundenen Volumina sind in Tab. 7 aufgeführt (zweite aufgelistete Zelle). 58 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $0,75 \pm 0,34$ bzw. $0,16 \pm 0,09 \mu\text{m}$

Tab. 7: Chlamydomonas reinhardii im vegetativen Zyklus mit CAP bei t = 0 + 12 h CAP, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischen Auswertungen von 75 bzw. 87 Serienschnitten durch zwei Gesamtzellen

Volumina in μm^3		Zelle 1	Zelle 2
Zelle		73,96	115,82
Kern		4,60	6,72
Chondriom		2,85	3,94
Mitochondrien	1	0,02	0,01
	2	0,03	0,01
	3	0,03	0,02
	4	0,10	0,02
	5	0,11	0,02
	6	0,21	0,02
	7	0,21	0,02
	8	0,21	0,02
	9	0,22	0,02
	10	0,22	0,02
	11	0,24	0,02
	12	0,28	0,03
	13	0,35	0,03
	14	0,62	0,03
	15	--	0,03
	16	--	0,04
	17	--	0,04
	18	--	0,04
	19	--	0,04
	20	--	0,04
	21	--	0,04
	22	--	0,04
	23	--	0,05
	24	--	0,05
	25	--	0,05
	26	--	0,05
	27	--	0,07
	28	--	0,07
	29	--	0,11
	30	--	0,13
	31	--	0,14
	32	--	0,17
	33	--	0,22
	34	--	0,37
	35	--	0,39
	36	--	0,42
	37	--	0,45
	38	--	0,60
Microbody-Cytosomen		0,16	0,14

Die Volumina der Einzelmitochondrien in den beiden morphometrisch ausgewerteten Zellen (Tab. 7) schwanken zwischen $0,01$ und $0,62 \mu\text{m}^3$; wie bei $t = 0$ oder $t = 6$ treten also wieder kleinere Mitochondrien auf. Dagegen hat sich das Volumen der Microbody-ähnlichen Cytosomen nochmals erhöht und beträgt nun $0,14$ bzw. $0,16 \mu\text{m}^3$, während die Relation von freien zu mitochondrienassoziierten Microbody-Cytosomen mit $1:5$ bzw. $3:13$ im Vergleich zu $t = 0 + 6$ h CAP in etwa gleichgeblieben ist. Auf die mögliche Bedeutung dieser Assoziationen für mitochondrielle Umbaureaktionen wird in der Diskussion noch hingewiesen (s. V 2 a).

c) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 9 + 20$ h CAP
(20stündige Behandlung während der Induktion von
Zellen der 9. Lichtstunde)

Werden Zellen aus der 9. Lichtstunde einer Dunkel-Kälte-Gametogenese in Gegenwart von CAP (2 mg/cm^3) unterzogen, so ist am Einzelbild praktisch kein Unterschied zur Kontrolle nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h ohne CAP feststellbar. Mitochondrienanschnitte werden nach wie vor häufig angetroffen, auch starke Vergrößerungen zeigen keine außerhalb des Rahmens liegenden Anomalien (Abb. 29, 30). Die Anordnung der Chloroplastenthylakoide entspricht ebenfalls den Verhältnissen in der Kontrolle.

Die Rekonstruktion einer Zelle nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h CAP ergibt in weiten Bereichen Übereinstimmung mit der Kontrolle bezüglich Lage und Form der Mitochondrien. Die 9 Mitochondrien sind in 42 Lobuli untergliedert, wobei die Zahl der Lobuli pro Mitochondrium zwischen 1 und 14 variiert. Die Volumina der Einzelmitochondrien schwanken zwischen $0,04$ und $1,28 \mu\text{m}^3$; die Gesamtvolumina von Zelle, Kern und Chondriom liegen allerdings an der unteren Grenze der Kontrolle - wie dort ist dies vermutlich auch hier auf eine unzureichende Vollsynchronisierung zurückzuführen, die sich offenbar in der 9. Stunde stärker bemerkbar macht.

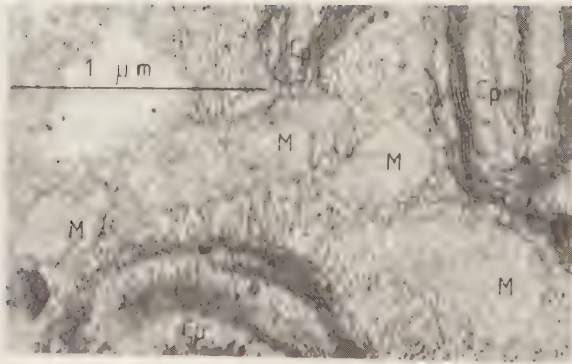


Abb. 29: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 9 + 20$ h CAP: Der Ausschnitt zeigt häufige Mitochondrienanschnitte (M); auch die Thylakoidanordnung im Chloroplasten (Cp, drei Anschnitte) entspricht der in der Kontrolle

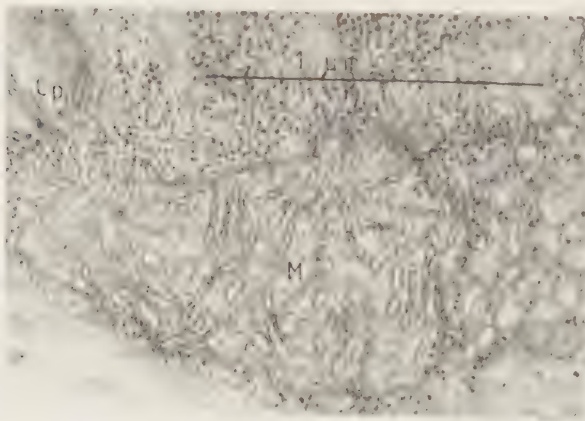


Abb. 30: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 9 + 20$ h CAP, Ausschnitt eines Mitochondriums (M) in Chloroplastennähe (Cp)

Tab. 8: Chlamydomonas reinhardii nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 9 + 20$ h CAP, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischer Auswertung von 73 Serienschritten durch eine Zelle

Volumina in μm^3		Zelle bei $t = 9 + 20$ h CAP
Zelle		151,36
Kern		5,78
Chondriom		3,44
Mitochondrien	1	0,04
	2	0,05
	3	0,10
	4	0,12
	5	0,13
	6	0,29
	7	0,71
	8	0,72
	9	1,28
Microbody-Cytosomen		0,12

Die genauen Werte zur Morphometrie der Zelle, des Kerns und der Mitochondrien können Tab. 8 entnommen werden.

Interessanterweise ist bei einem mit $0,12 \mu\text{m}^3$ der Kontrolle entsprechenden Volumen der Microbody-ähnlichen Cytosomen deren Relation von freien zu mitochondrienassoziierten Strukturen im Gegensatz zu einem in etwa ausgeglichenen Verhältnis bei der Kontrolle hier auf 2:8 zurückgegangen. Dieses Anwachsen von Microbody-Cytosomen in Mitochondriennähe entspricht den Gegebenheiten in den anderen nach CAP-Behandlung untersuchten Zellen, ist also offenbar von einer ultrastrukturell sichtbaren Mitochondrienschädigung unabhängig.

d) Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadium $t = 0 + 20$ h CAP
(20stündige Behandlung während der Induktion von
Zellen bei Lichtbeginn)

Nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese in Gegenwart von CAP (2 mg/cm^3) von Zellen aus dem Stadium $t = 0$ des vegetativen Zyklus entspricht die ultrastrukturelle Organisation des Chloroplasten zwar wie bei $t = 9 + 20$ h CAP der Kontrolle, doch sind im Gegensatz dazu Unterschiede im Mitochondrienbestand im Vergleich zur Kontrolle bei $t = 0 + 20$ h ohne CAP deutlich feststellbar.

Die Lage der Mitochondrien bleibt noch relativ gleich; sie erfahren allerdings eine insgesamt stärkere Konzentration in der Gegend der Geißelbasis bzw. der Kontraktilen Vakuole und in Kernnähe (Abb. 31, 32), während Mitochondrienanschnitte in anderen Zellregionen und insbesondere zwischen Chloroplast und Plasmalemma wie in Abb. 33 seltener werden. Die Mitochondrienprofile zeigen großflächigere Ausdehnungen, die in manchen Einzelschnitten extrem überdimensioniert erscheinen können (Abb. 32), während Cristae und Matrixstrukturen offenbar normal ausgeprägt sind. Keinesfalls werden besonders elektronendichte oder teilweise elektronenleere Stellen gefunden wie im vegetativen Stadium bei $t = 0 + 6$ h CAP, auch sind die Mitochondrien nicht lokal begrenzt aufgebläht, sondern als Ganzes offenbar überall gleichmäßig angeschwollen. Assoziationen von Microbody-Cytosomen mit Mitochondrien sind dagegen auch hier sehr häufig (Abb. 34).

Der am Einzelschnitt gewonnene Eindruck wird bei der Auswertung von Zellserien bestätigt. Wie bei $t = 0 + 20$ h ohne CAP war es auch hier beim Vorliegen von Schnittbändern möglich, teilweise bereits beim Durchmustern einer Zellserie am Elektronenmikroskop die Zahl der Mitochondrien zu bestimmen, so daß bei zwei von vier ausgewerteten Zellen auf die dreidimen-



Abb. 31: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 0 + 20$ h CAP, etwas schräg getroffener Längsschnitt: Mitochondrienanschnitte (M) sind auf dem Einzelschnitt nur in relativ geringer Zahl feststellbar (hier nur ein einziger Anschnitt) und werden häufig apikal vom Kern (K) in der Gegend der Kontraktilen Vakuole (KV) bzw. der Geißelbasis angetroffen; die ultrastrukturelle Organisation des Chloroplasten (Cp) entspricht der der Kontrolle nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h ohne CAP



Abb. 32: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = G + 20$ h CAP, sehr hoch apikal schräg getroffener Längsschnitt: In der Region der Insertionsstelle der Geißeln (G) werden die größten Mitochondrienanschnitte (M) gefunden; der Kern (K) ist noch abgebildet, während der Chloroplast bereits zu weit distal liegt

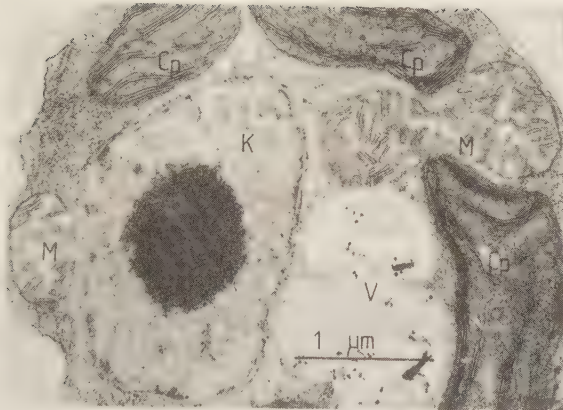


Abb. 33: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 0 + 20$ h CAP, Ausschnitt aus einem Querschnitt etwa in Höhe der Kernmitte: Mitochondrien (M) werden wie bei $t = 0$ oder $t = 0 + 20$ h auch in diesen Regionen gefunden, Cristae und Matrix erscheinen normal ausgeprägt; der Kern (K) liegt etwas randständig, zwischen ihm und dem Chloroplasten (Cp, drei Anschnitte) ist eine Vakuole (V) sichtbar

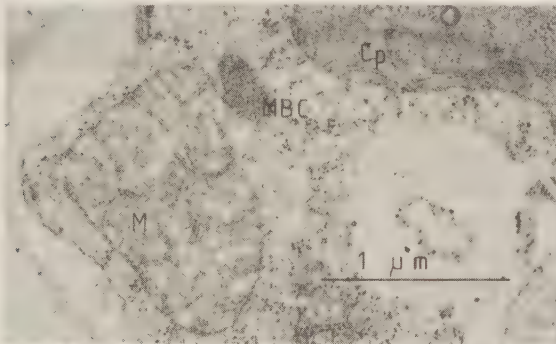


Abb. 34: *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 0 + 20$ h CAP, Ausschnitt: ein Microbody-Cytosom (MBC) ist mit einem Mitochondrium (M) assoziiert; im oberen Teil des Bildes befindet sich ein Chloroplastenanschnitt (Cp)

sionale Rekonstruktion verzichtet wurde. In vier Zellen wurden 3, 5, 6 und 7 relativ plump gebaute Mitochondrien gezählt; im Vergleich zur Kontrolle ist also ein geringer Rückgang der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle nachweisbar. Dies geht Hand in Hand mit dem überraschenden Befund, daß teilweise über einen weiten Bereich, manchmal bis zu



Abb. 35: Chondriom einer Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 0 + 20$ h CAP, Modell der 3 Mitochondrien nach Auswertung von 67 Serienschnitten durch die gesamte Zelle: Neben 1 kleineren, sphäroidischen Gebilde sind 2 größere Megamitochondrien abgebildet; die Mitochondrien zeigen keine lokalen Aufblähungen wie bei $t = 0 + 6$ h CAP (Abb. 26), sondern sind überall gleichmäßig verdickt; die Anschwellungen sind andererseits bedeutend stärker als nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h ohne CAP (Abb. 20). Die aufgrund morphometrischer Auswertungen gefundenen Volumina sind in Tab. 9 wiedergegeben (erste aufgelistete Zelle). 7 Messungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten des Modells ergaben für die langen und kurzen Achsen Werte von $1,56 \pm 0,65$ bzw. $0,50 \pm 0,11 \mu\text{m}$

Tab. 9: Chlamydomonas reinhardii nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP bei $t = 0 + 20$ h CAP, Volumina von Zelle, Kern, Chondriom, Einzelmitochondrien und Microbody-ähnlichen Cytosomen nach morphometrischen Auswertungen von 55 bzw. 67 Serienschritten durch zwei Gesamtzellen

Volumina in μm^3		Zelle 1	Zelle 2
Zelle		65,32	64,54
Kern		4,65	4,40
Chondriom		2,65	2,28
Mitochondrien	1	0,19	0,06
	2	0,93	0,24
	3	1,53	0,36
	4	--	0,40
	5	--	0,60
	6	--	0,62
Microbody-Cytosomen		0,10	0,09

einem Drittel der Zelle, in den Einzelschnitten einer Zellsérie kein einziger Mitochondrienanschnitt zu finden ist. Auch die Lobulierung der Mitochondrien nimmt ab; in den beiden detailliert untersuchten Zellen sind 6 bzw. 9 unterscheidbare Mitochondrienuntereinheiten vorhanden (1 bis 3 pro Mitochondrium). Dieser bereits nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h ohne CAP feststellbare Delobulierungseffekt führt hier bei $t = 0 + 20$ h CAP soweit, daß diese mitochondriellen Substrukturen rein größenmäßig nicht mehr grazilen Lobuli entsprechen, sondern zu größeren Agglomeraten an- und zusammengeschwollen sind. Wie die an 7 verschiedenen Abschnitten eines Modells (Abb. 35) durchgeführten Messungen der langen und kurzen Achsen zeigen, ergibt sich eine Verbreiterung der kurzen Achsen im Vergleich zur Kontrolle auf den etwa doppelten Wert von $0,50 \pm 0,11$

μm - dies stellt sogar ein rund 5faches Anwachsen gegenüber $\bar{t} = 0$ dar! -, während die langen Achsen mit $1,56 \pm 0,65 \mu\text{m}$ praktisch denselben Wert erreichen wie die Kontrolle.

Die Volumina der Einzelmitochondrien in den beiden nach dreidimensionaler Rekonstruktion untersuchten Zellen schwanken zwischen $0,06$ und $1,53 \mu\text{m}^3$ (Tab. 9); ihre Zellrelationen variieren von $0,09$ bis $2,34 \%$ des Zellvolumens und liegen damit für die größten Werte etwa 1,5fach über der Kontrolle. Die Relation des gesamten Chondrioms zum Zellvolumen im Vergleich zur Kontrolle ist dagegen ebenso wie die Relation des Kerns zum Zellvolumen nur geringfügig auf den ca. 1,1-fachen Wert angewachsen. Das Volumen der Microbody-ähnlichen Cytosomen liegt mit $0,09$ bzw. $0,10 \mu\text{m}^3$ ebenfalls über dem der Kontrolle; wie in den anderen unter CAP-Einfluß stehenden Zellen hat sich auch hier die Relation von freien zu mitochondrienassoziierten Strukturen mit 1:5 bzw. 1:4 zugunsten der assoziierten Microbody-Cytosomen verschoben.

V. DISKUSSION

1. DER MITOCHONDRIENBESTAND IM VERLAUF DES ZELLZYKLUS

a) Der mitochondrielle Subzyklus

Die vorliegenden Untersuchungen der Stadien $t = 0$ und $t = 6$ des vegetativen Zyklus sowie der Dunkel-Kälte-Gametogenese-Stadien $t = 9 + 20$ h und $t = 0 + 20$ h ermöglichen es, den mitochondriellen Subzyklus im Verlauf des vegetativen und generativen Zellzyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* zu ergänzen bzw. frühere Ergebnisse von GROBE und ARNOLD (1975), OSAFUNE et al. (1975c), GROBE (1976), OSAFUNE et al. (1976) sowie GROBE und ARNOLD (1977), nicht zuletzt aber auch von SCHÖTZ et al. (1972) zu vervollständigen.

Im Gegensatz zur Sporenfreisetzung synchronisierter Zellkulturen verläuft der mitochondrielle Subzyklus vermutlich weniger synchron, so daß der Mitochondrienbestand auch in Zellen desselben Stadiums einen relativ großen Varianzbereich zeigen kann. Bestimmte Tendenzen im Auf- und Abbau stadien-typischer Mitochondrienstrukturen sind andererseits in jedem Fall erkennbar, besonders wenn mehrere Zellen desselben Stadiums im Vergleich vorliegen oder sich neu untersuchte Zellen lückenlos in die bereits vorhandenen Ergebnisse einfügen lassen (ARNOLD und BLANK, in press). Der mitochondrielle Subzyklus im Verlauf des Lebenszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* repräsentiert sich damit nunmehr wie in Abb. 36 dargestellt (frühere Untersuchungen anderer Autoren sind mit deren Namen und Publikationsjahr versehen).

Beginnend mit $t = 0$ des synchronisierten vegetativen Zellzyklus (Lichtbeginn) sind in zwei Zellen 5 bzw. 11 Mitochondrien vorhanden, die ovoid oder länglich und wenig verzweigt sind und überwiegend periphere Zellregionen zwischen Chloro-

plast und Plasmalemma oder in der Region der Geißelbasis besetzen - treten mehr Mitochondrien auf, so ist die Zahl der ovoiden Organellen höher; für eine geringere Anzahl von Mitochondrien pro Zelle gilt umgekehrt, daß dann eher längliche und weniger sphäroidische Gebilde vorhanden sind.

Im Verlauf des Zellwachstums nimmt in Übereinstimmung mit OSAFUNE et al. (1975c) die Zahl der Mitochondrien zu (43 bzw. 51 Mitochondrien in zwei Zellen bei $t = 6$). Nunmehr sind überwiegend sphäroidische Gebilde zu finden, daneben auch längliche Formen mit geringem Verzweigungsgrad; außerdem ist eine Verlagerung der Mitochondrien in mehr zentrale Zellbereiche festzustellen. Diese kleineren Mitochondrien fusionieren bei $t = 9$ zu hoch verzweigten Riesenmitochondrien (OSAFUNE et al., 1975c), teilen sich aber offenbar noch in der Mutterzelle vor der Cytokinese in mehrere, wieder etwas kleinere Gebilde mit geringerem Verzweigungsgrad ($t = 14$; Dunkelfase des Synchronzyklus), der bis $t = 16$ noch weiter abnimmt, so daß in den Tochterzellen eher kleinere und weniger verzweigte Formen vorliegen (OSAFUNE et al., 1976). Der Mitochondrienbestand in diesem Stadium entspricht damit möglicherweise wieder dem bei $t = 0$ zu Belichtungsbeginn.

Der mitochondrielle Subzyklus innerhalb des vegetativen Lebenszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* äußert sich also in zellstadienspezifischen Umbaureaktionen des Chondrioms. Die Morphodynamik dieses Organellenkomplexes bleibt dabei offenbar ständig gewahrt, so daß die gesamte Mitochondrienpopulation eines Zellstadiums innerhalb bestimmter Grenzen variieren kann, während es andererseits im Verlauf von Zellwachstum und -teilung gleichzeitig zur Proliferation und Teilung des Chondrioms kommt. Einfacher gebaute Mitochondrien fusionieren dabei zu solchen mit höherem Verzweigungsgrad, bis schließlich Riesenmitochondrien entstehen, die sogar untereinander noch vernetzt sein können und dann Mitochondrien-

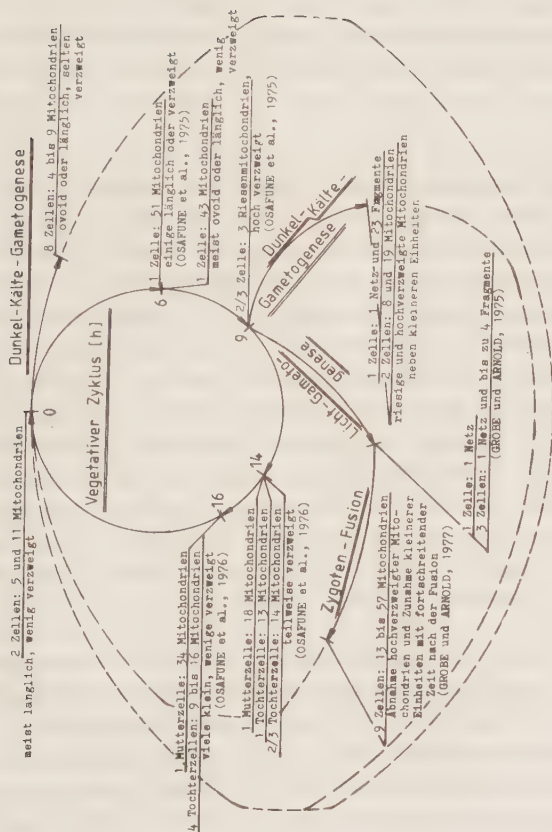


Abb. 36: Ablauf des mitochondriellen Subzyklus im Verlauf des Zellzyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* (Ergänzung der Daten verschiedener Autoren durch eigene Ergebnisse)

netze bilden. Beim Zerfall dieser Netze werden wieder kleinere Einheiten abgegliedert, bis mit ovoiden Formen die stärkste Aufgliederung erreicht ist. An diesen kleinsten Mitochondrien sind in der Regel keine Substrukturen mehr erkennbar, während die länglichen und verzweigten Mitochondrien ebenso wie die einzelnen Maschen eines Netzwerks nicht einfach siphonal gebaut, sondern deutlich in mitochondrielle Untereinheiten untergliedert sind.

Für diese kleinsten Bausteine eines Chondrioms, die als ovoide Mitochondrien auch frei auftreten können, häufig aber zu länglichen oder verzweigten Formen fusioniert sind, wird hier die Bezeichnung "Lobuli" vorgeschlagen. Allerdings darf auch ein Lobulus nicht als starres Gebilde und letztendlich feste Einheit aufgefaßt werden; die Bestimmung des Lobulierungsgrades des in einer Zelle vorliegenden Chondrioms, also der Anzahl der Lobuli pro Zelle, unterliegt daher teilweise der subjektiven Betrachtungsweise des Beobachters (vergl. II 2 c). Überwiegend aufgrund präparativer Artefakte, z. B. ungenügender Erkennbarkeit des Membranverlaufs bei schräg geschnittenen Membranen, dürfte die Zahl der Lobuli eines Chondrioms aber eher noch höher anzusetzen sein als angegeben wurde; die Fehlerquelle liegt also vor allem in der Nichterfassung von Lobuli.

Beobachtungen zur Lobulierung von Mitochondrien liegen auch bei *Polytoma papillatum* vor; die mitochondriellen Untereinheiten sind dort jedoch durch deutlichere Abschnürungen besser voneinander abgegrenzt und ergeben eine eher "perlschnurartige" Anordnung (GAFFAL und KREUTZER, 1977). Die als "Perlen" bezeichneten Substrukturen des Chondrioms von *Polytoma* entsprechen andererseits aber sicher den hier für *Chlamydomonas* beschriebenen Lobuli.

Unter Berücksichtigung des DNA-Gehalts im Chondriom von *Chlamydomonas* (RYAN et al., 1973, 1978) erscheint bei der

Einführung dieses Begriffes in die Mitochondrienmorphologie der genetische Aspekt von besonderem Interesse. Die Auswirkung des Polyploidiegrads auf die Lobulierung der Mitochondrien kann im Augenblick jedoch nur diskutiert werden. Die Beantwortung der Frage, ob ein Lobulus, möglicherweise auch von der genetischen Seite her als kleinster Baustein anzusehen, also noch mit einem Genom ausgestattet ist, bleibt späteren Untersuchungen vorbehalten.

Bei der Betrachtung der Morphologie des Chondrioms in generativen Zellstadien werden in Abhängigkeit von der Art der Umstimmung zu Gameten unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Nach Dunkel-Kälte-Gametogenese von Zellen des Stadiums $t = 0$ ist Hand in Hand mit einer geringen Abnahme der Mitochondrienzahl pro Zelle eine leichte Mitochondrienvergrößerung festzustellen. Lage und Formen der Mitochondrien bleiben dagegen konstant. Dies gilt auch für die Induktion von Zellen aus dem vegetativen Stadium $t = 9$ unter diesen Bedingungen, doch kommt es hier offenbar nicht zu Mitochondrienvergrößerungen. Die in diesem Zellstadium auftretenden Riesemitochondrien können auch zu einem Mitochondriennetz fusioniert sein.

Im Gegensatz zur Dunkel-Kälte-Gametogenese, die ohne Zellteilungen abläuft, so daß der morphologische Zellzustand der Ausgangskulturen erhalten bleibt, kommt es bei Gametogenese im Licht zu einer gametogenetischen Teilung von Zellen aus dem vegetativen Stadium bei $t = 9$. In den danach vorliegenden kreuzungsbereiten Gameten werden ebenfalls hochverzweigte Riesemitochondrien angetroffen, die hier aber praktisch ausnahmslos zu Netzwerken fusioniert sind (GROBE und ARNOLD, 1975). Diese Mitochondriennetze liegen im Gegensatz zur Dunkel-Kälte-Induktion von Zellen aus dem Stadium $t = 9$ überwiegend in den peripheren Zellregionen außerhalb des Chloroplastenbeckers. Nach der Gametogamie zerfallen sie recht rasch in kleinere Einheiten, wobei mit fortschreitender Zeit

nach der Gametenfusion eine Abnahme hochverzweigter Mitochondrien bei gleichzeitigem Anstieg kleinerer Gebilde festzustellen ist. Die maximale Zahl pro Zelle wird mit 57 Mitochondrien angegeben (GROBE und ARNOLD, 1977); dies entspricht in etwa den Werten bei $t = 6$ im vegetativen Zyklus. Ob diese Zahl die überhaupt je auftretende Maximalzahl von Mitochondrien pro Zelle bei *Chlamydomonas reinhardtii* darstellt, und ob diese Zahl ebenfalls mit der Anzahl der Genomkopien korreliert ist, bleibt allerdings fraglich.

Bei einem Vergleich mit den Ergebnissen von SCHÖTZ et al. (1972), die Gameten aus Asynchronkulturen gewonnen hatten, und deren Mitochondrienbestand daher nicht in das Schema in Abb. 36 einzuordnen ist, fällt auf, daß die dort erhaltenen Resultate mit den hier vorliegenden Befunden des vegetativen Stadiums bei $t = 0$ sehr gut übereinstimmen. Sie ähneln dagegen gar nicht dem Mitochondrienbestand von Gameten nach Lichtinduktion aus Zellen bei $t = 9$. Vielleicht ist dies darauf zurückzuführen, daß gametogene Kulturen ebenso wie vegetative Zellkulturen ein gewisses Zellwachstum zeigen können, in dessen Verlauf es dann zu einer Mitochondrienproliferation kommen könnte. Auch GROBE (1976) fand in einem Gameten nach Lichtinduktion aus Zellen der 9. Lichtstunde 9 Mitochondrien pro Zelle und damit eine Abweichung von der in ihrem Fall geltenden Norm.

Der mitochondrielle Subzyklus im Verlauf des Lebenszyklus der einzelligen Alge *Polytoma papillatum*, die statt des *Chlamydomonas*-typischen Chloroplasten einen Leukoplasten besitzt, und deren Mitochondrienverhalten ausführlich beschrieben wurde (GAFFAL und KREUTZER, 1977; GAFFAL und SCHNEIDER, 1978), zeigt einen anderen Entwicklungsablauf als bei *Chlamydomonas reinhardtii*. Dort ist letztlich in jedem Zellstadium ein Mitochondriennetz oder zumindest noch ein Netzwerkfragment vorhanden, während die Zahl der davon abgegliederten Einzelmitochondrien im Verlauf des Zellzyklus

bis auf etwa 240 während der späten Telophase und frühen Cytokinese ansteigen kann (GAFFAL und SCHNEIDER, in press). Wie bereits erwähnt wurde, zeigen die Mitochondrien von *Polytoma* auch eine deutlichere Gliederung in lobuläre Einheiten.

b) Größen der Mitochondrien

Die anhand von Längenmessungen an verschiedenen Mitochondrienabschnitten zweier Modelle ($t = 0$ und $t = 9 + 20$ h) ermittelten Werte für die langen und kurzen Achsen der Mitochondrien zeigen mit $0,93 \pm 0,53$ bzw. $0,10 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ($t = 0$; 23 Messungen) und $1,09 \pm 0,50$ bzw. $0,10 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ($t = 9$; 40 Messungen) gute Übereinstimmung der Mitochondrienachsen des Chondrioms von Zellen zu Lichtbeginn und solchen mit Riesenmitochondrien nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese von Zellen der 9. Lichtstunde. Ein Mitochondrienmodell von Zellen des Stadiums $t = 6$ wurde nicht erstellt, eine vergleichbare Achsenvermessung für dieses Stadium war daher nicht möglich. Aufgrund der Zunahme rundlich-ovoider Mitochondrien sinkt hier der Wert für die langen Achsen vermutlich ab, während sich der für die kurzen Achsen eher erhöhen dürfte.

Für $t = 0 + 20$ h wurde ein Ansteigen der Werte sowohl für die langen als auch für die kurzen Achsen beobachtet ($1,51 \pm 0,48$ bzw. $0,25 \pm 0,10 \mu\text{m}$; 12 Messungen). Diese Mitochondrienvergrößerung ist offenbar auf die ungünstigen Umweltbedingungen zurückzuführen (stickstofffreies Medium, Dunkelheit, Kälte), auf die diese Kulturen vielleicht empfindlicher reagieren als solche bei $t = 9 + 20$ h. Insbesondere eine durch Kälte induzierte Phasenveränderung der Mitochondrienmembranen wäre dabei denkbar (vergl. RAISON et al., 1971). Auch eine erhöhte Aktivität des Mitochondrienstoffwechsels aufgrund des Ausfalls der Chloroplastenfunktionen

im Dunkeln wäre zu diskutieren; ein erhöhter Sauerstoffbedarf müßte durch die ständige Begasung der Kulturen während der Induktion allerdings abgedeckt worden sein, so daß eine Abnahme der Mitochondrienzahl pro Zelle durch anaerobe Bedingungen (OLIVEIRA, 1977; ROSSI und COCUCCI, 1978) bzw. eine damit verbundene Mitochondrienvergrößerung (MAY, 1978) eigentlich auszuschließen ist.

Leider liegen für die von OSAFUNE et al. (1975c) beschriebenen, hochverzweigten Riesenmitochondrien keine Achsenvermessungen vor - die Bildung dieser Riesenmitochondrien während des vegetativen Zyklus wird nämlich nach OSAFUNE et al. (1972a, 1972b) von einer Abnahme der Sauerstoffaufnahmeaktivität begleitet. Da zu dieser Zeit des vegetativen Zyklus ($t = 9$) die Chloroplastentätigkeit sicher über die Mitochondrienaktivität dominiert, ist diese Erklärung einleuchtend; sie könnte aber auch auf einem Meßfehler beruhen, der in einer Überkompensierung des Sauerstoffverbrauchs durch kräftig erhöhte Sauerstoffproduktion aufgrund hoher Photosyntheseraten und dadurch nicht relativierbaren Sauerstoffmessung in der Zellsuspension begründet wäre. Andererseits korrelieren die Achsenwerte nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 9 + 20$ h mit denen von $t = 0$; zumindest eine Verbreiterung der kurzen Achsen während der Dunkel-Kälte-Induktion von Zellen aus $t = 9$ erscheint daher unwahrscheinlich. Die Achsenvergrößerung der Mitochondrien nach Dunkel-Kälte-Gametogenese von Zellen aus $t = 0$ wäre dann aber eigentlich nur durch die größere Anfälligkeit von Zellen bei $t = 0$ im Vergleich zu $t = 9$ gegen Umwelteinflüsse von außen zu erklären.

Während die Mitochondriendurchmesser von Hefezellen mit 0,2 bis 0,6 μm angegeben werden (HOFFMANN und AVERS, 1973), die der Chloromonade *Gonyostomum semen* mit 0,7 bis 3,6 μm (HEYWOOD, 1977) und die langen bzw. kurzen Mitochondrienachsen in jüngeren Tochterzellen von *Polytoma papillatum* je nach

Verzweigungsgrad mit $0,78 \pm 0,02$ bis $0,82 \pm 0,03 \mu\text{m}$ bzw. $0,52 \pm 0,02$ bis $0,62 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (GAFFAL und KREUTZER, 1977), liegen die entsprechenden Werte für Asynchrongameten von *Chlamydomonas reinhardtii* bei $0,4$ bis $5,4 \mu\text{m}$ bzw. $0,17$ bis $0,42 \mu\text{m}$ (ARNOLD et al., 1972), für lichtinduzierte Gameten aus $t = 9$ bei $0,33$ bis $3,25 \mu\text{m}$ bzw. $0,15$ bis $0,27 \mu\text{m}$ und für Zygoten bei $0,59$ bis $1,33 \mu\text{m}$ bzw. $0,22$ bis $0,35 \mu\text{m}$ (GROBE, 1976). Diese Daten zeigen, daß die Mitochondrienachsen für unterschiedliche Organismen durchaus verschiedenen sein können; die für *Chlamydomonas reinhardtii* erhaltenen Werte korrelieren dagegen in weiten Bereichen mit den hier ermittelten Daten.

Bei der Betrachtung der Volumenrelationen von Kern, Chloroplast und Chondriom ergibt sich mit einem volumenmäßigen Anteil am Zellvolumen von ca. 40 % für den Chloroplasten und etwa 2,5 bis 3 % für das Chondriom gute Übereinstimmung mit den Angaben von SCHÖTZ et al. (1972) sowie GROBE (1976) für *Chlamydomonas* und sogar mit den Daten von ATKINSON et al. (1974) für *Chlorella*. Die von FISCHER (1969) nach Auswertung von Einzelschnitten ermittelten Werte liegen für das Chondriom von *Chlamydomonas* eher niedriger und variieren für den Chloroplasten in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen im Stark- und Schwachlicht. Sehr große Varianzen zeigt die Kernrelation mit Anteilen von gut 3 bis über 14 % (FISCHER, 1969; SCHÖTZ et al., 1972; MATAGNE et al., 1979), doch beruhen solche extremen Unterschiede nicht zuletzt auch auf unvollständiger Synchronisierung oder unterschiedlichem Entwicklungszustand der Zellen in verschiedenen Versuchen.

Relativ deutlich zeigt dies ein Beispiel mit (haploiden) Gameten und (diploiden) Zygoten: Während MATAGNE et al. (1979) eine deutliche Verdoppelung von Zell- und Kernvolumen finden (von ca. 30 auf $60 \mu\text{m}^3$ bzw. von ca. 3 auf $6 \mu\text{m}^3$), liegt das von GROBE (1976) erhaltene Zellvolumen für zwei Zygoten mit 100 bzw. $123 \mu\text{m}^3$ sogar unter dem eines Gameten ($131 \mu\text{m}^3$), nur

das Volumen einer Zygote darüber ($184 \mu\text{m}^3$); und dies gilt auch entsprechend für die Volumina des Chondrioms. Insgesamt erscheint es daher vorteilhafter, beim Vergleich unterschiedlicher Zellstadien Volumenrelationen anzugeben.

Andererseits ist es überraschenderweise durchaus möglich, beim Vergleich auch verschiedener Mitochondrienmodelle mit deren absoluten Volumina zu übereinstimmenden Größenvorstellungen zu gelangen. Aufgrund der von $t = 0$, $t = 6$, $t = 9 + 20 \text{ h}$ und $t = 0 + 20 \text{ h}$ erhaltenen Werte sowie den Daten von SCHÖTZ et al. (1972) und GROBE (1976) soll daher an dieser Stelle der Versuch gemacht werden, unter Abwägung verschiedener Merkmale und mit größter Vorsicht folgende Klassifizierung der Mitochondrien von Chlamydomonas reinhardtii nach ihren Volumina vorzuschlagen (vergl. BLANK und ARNOLD, in press):

bis $0,03 \mu\text{m}^3$	- winzige Mitochondrien;
$0,04$ bis $0,09 \mu\text{m}^3$	- kleine Mitochondrien;
$0,10$ bis $0,50 \mu\text{m}^3$	- mittlere Mitochondrien;
über $0,50 \mu\text{m}^3$	- große Mitochondrien.

Die Mitochondrien mit großen Volumina wären noch weiter zu unterteilen, wenn hochverzweigte Riesen- und Netzmitochondrien in die Klassifizierung einbezogen werden:

etwa $1 \mu\text{m}^3$	- Riesenmitochondrien;
etwa $4 \mu\text{m}^3$	- Mitochondriennetze.

Der Wert für Riesenmitochondrien stellt dabei nur eine untere Grenze dar, kann also auch auf größere Mitochondrien mit hohem Verzweigungsgrad (Netzwerkbruchstücke) oder auch auf Mitochondriennetze selbst angewandt werden. Keinesfalls zu verwechseln ist dieser Begriff aber mit dem Terminus Megamitochondrien, der allein Mitochondrien mit im zweidimensionalen Bild großflächigen Anschnitten vorbehalten werden sollte (zur Definition von Megamitochondrien vergl. V 2 b).

Möglicherweise wird die eben durchgeführte Mitochondrienklassifizierung willkürlich erscheinen, doch darf hier auf die Mitochondrien in Abb. 17 und ihre in Tab. 4 (zweite aufgelistete Zelle) angegebenen Volumina verwiesen werden. Die obere, mittlere und untere Reihe der Einzelmitochondrien in Abb. 17 ergibt nach der durchgeführten Einteilung eine Größenanordnung in der Reihenfolge winzig, klein und mittel, während der Wert für Mitochondriennetze in guter Übereinstimmung mit den von GROBE (1976) erhaltenen Volumina steht. Ein Vergleich der anderen Mitochondrienmodelle mit ihren Volumina vervollständigt die vorgeschlagene Einteilung.

Andererseits ist jede Klassifizierung nicht völlig frei von jeglicher Willkür. Beispielsweise wird der Verzweigungsgrad der Mitochondrien hier sicher zu wenig berücksichtigt. Da aber die Mitochondrien aufgrund der diesen Organellen eigenen Morphodynamik keine starren Gebilde darstellen und Verzweigungen vermutlich ständig aufgebrochen oder neu geknüpft werden, erscheint eine Einteilung nach diesem Gesichtspunkt kaum günstiger. Dagegen führt die vorgeschlagene Klassifizierung leichter zu einer möglicherweise zellstadienspezifischen Mitochondrienbeschreibung.

So treten in den Zellen bei $t = 0$ winzige, kleine, mittlere und große Mitochondrien auf. Bei $t = 6$ sind kaum winzige, viele kleine und mittlere, aber kein großes Mitochondrium vorhanden, während bei $t = 9 + 20$ h sogar Riesemitochondrien oder Mitochondriennetze gefunden werden. Bei $t = 0 + 20$ h gibt es wiederum keine winzigen und kaum kleine Mitochondrien, doch stellt dieses Stadium in gewisser Weise aufgrund der geringeren Unterscheidbarkeit der Lobuli einen Sonderfall dar. Dies wird im Zusammenhang mit der Bildung von Megamitochondrien nach Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP später noch diskutiert.

2. DER MITOCHONDRIENBESTAND NACH CHLORAMPHENICOLBEHANDLUNG

a) Morphologie und Morphometrie

pathologisch veränderter Mitochondrien

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch Applikation von CAP enorm vergrößerte Mitochondrien in *Chlamydomonas reinhardtii* zu induzieren. Dabei wurde im Vergleich zu anderen Ultrastrukturuntersuchungen bewußt ein nicht zu langer Behandlungszeitraum, aber eine hohe CAP-Konzentration (2 mg/cm^3) gewählt. Im günstigsten Fall sollte es möglich werden, das dreidimensionale Aussehen von - im Gegensatz zu Riesenmitochondrien (Netzwerkfragmenten) - als Megamitochondrien zu bezeichnenden Mitochondrien mit auf dem Einzelschnitt extrem großflächigen Anschnitten zu beschreiben (vergl. ALBRING et al., 1975; ASHOUR et al., 1980). Solche großen Flächenanschnitte wurden zwar bereits häufig anhand von Einzelbildern für unterschiedliche Organismen oder Gewebe nachgewiesen (vergl. I 2 b), doch existieren keinerlei Literaturangaben zum dreidimensionalen Aussehen dieser Mitochondrien.

Für *Chlamydomonas reinhardtii* wurden solche Mitochondrienvergrößerungen noch nicht einmal nach CAP-Behandlung beschrieben, sondern nur nach Behandlung mit dem Aminoglykosidantibiotikum Gentamycin (ZETTEL und ARNOLD, 1977), während in anderen Zellen nach Applikation von CAP unterschiedliche Befunde resultieren: Bei *Pythium ultimum*, *Rhodotorula glutinis*, *Ochromonas danica*, *Polytomella caeca* und *Tetrahymena pyriformis* kommt es offenbar überwiegend zu einer Schädigung der Mitochondrieninnenstrukturen, teilweise sogar zur Bildung kleinerer Organellen (EVANS und LLOYD, 1967; SMITH und MARCHANT, 1968; LLOYD et al., 1970; SMITH-JOHANNSEN und GIBBS, 1972; CURGY et al., 1980), während für *Euglena gracilis* ungewöhnliche Größen und Formen nachgewie-

sen wurden (NEUMANN und PARTHIER, 1973). Andererseits wurden hierbei extrem großflächige Mitochondrienanschnitte nicht immer beobachtet (PARTHIER, persönliche Mitteilung); wie bei *Chlamydomonas reinhardtii* hängt die Wirkungskapazität offenbar auch bei *Euglena gracilis* vom Zeitpunkt der Applikation während des Zellzyklus ab (BRANDT, 1979).

Geht man bei *Chlamydomonas reinhardtii* von $t = 9$ des vegetativen Zyklus aus und behandelt diese Kulturen während einer Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP ($t = 9 + 20$ h CAP), so sind praktisch keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Dies steht in Übereinstimmung mit den aufgrund von Vorversuchen erhaltenen Ergebnissen (III 2 a), wonach die 9. Lichtstunde relativ weniger gehemmt wird als die Kulturen bei Lichtbeginn.

Die zu diesem Zeitpunkt bei $t = 0$ vorliegenden Mitochondrien sind ovoid oder länglich, dann aber von ziemlich schlankem Aussehen. Werden Kulturen bei Lichtbeginn für 6 h mit CAP behandelt, verdicken sie sich etwas und bilden an lokal begrenzten Stellen große Aufblähungen aus ($t = 0 + 6$ h CAP). In diesen Regionen ist die Innenstruktur teilweise völlig elektronenleer, während vorhandene Restmatrix oder Cristae verdichtet und stärker kontrastiert sind (vergl. SMITH et al., 1970; CURGY et al., 1980). Die normalerweise im Verlauf des Lebenszyklus stattfindende Mitochondrienproliferation ist ähnlich wie die vielleicht vergleichbare Septenbildung und Zellteilung bei *Bacillus subtilis*, die ebenfalls eine chloramphenicolabhängige und zellzyklusspezifische Hemmung erfährt (MIYAKAWA et al., 1980), unterbunden; möglicherweise wird der Aufbau von kontraktilen Proteinen gehemmt, denen bei Mitochondrienbewegungen und -teilungen eine Schlüsselrolle zukommen soll (KUROIWA und KUROIWA, 1980; KUROIWA und TAKAHASHI, 1980).

Nach weiteren 6 h der fortgesetzten CAP-Behandlung erschei-

nen die Mitochondrien wieder dünner; die regional verdickten Bezirke sind nicht mehr auffindbar, die Innenstruktur hat sich normalisiert ($t = 0 + 12 \text{ h CAP}$). Damit wäre es durchaus vorstellbar, daß über einen mitochondrieneigenen Reparaturmechanismus die geschädigten Stellen abgeschnitten worden sind; hantelförmige mitochondrielle Teilungsstadien sind im zweidimensionalen Bild häufig vertreten und erscheinen im dreidimensionalen Modell meist als in der Aufsicht langgestreckte Formen mit dünnen Verbindungen zwischen stärker verdickten Enden. Diese Art eines mitochondriellen Reparaturmechanismus in Form von Teilungen geschädigter Mitochondrien wurde bereits beschrieben (TANDLER et al., 1969; TANDLER und HOPPEL, 1973). Die durch die CAP-bedingte Hemmung der mitochondriellen Proteinbiosynthese hervorgerufene Unterdrückung der Mitochondrienproliferation ist somit offenbar aufgehoben worden (vergl. NUSSDORFER et al., 1979).

Die Mitochondrien von Zellen aus $t = 0$ zeigen nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese bereits ohne CAP im Vergleich zum Ausgangsstadium deutliche Verbreiterungen, deren Werte jedoch nach der Behandlung mit dem Antibiotikum während einer Dunkel-Kälte-Gametogenese nochmals deutlich erhöht sind ($t = 0 + 20 \text{ h CAP}$). In diesem Stadium sind die Mitochondrienvergrößerungen im Gegensatz zur CAP-Behandlung während des vegetativen Zyklus nicht lokal begrenzt, sondern erstrecken sich vielmehr gleichmäßig über die Mitochondrien in ihrer gesamten Ausdehnung. Die mitochondrielle Innenstruktur bleibt dabei gewahrt. Inwieweit Veränderungen der Innenstruktur bei Behandlung im Licht auf einem unterschiedlichen physiologischen Zustand der Mitochondrien im Vergleich zur Dunkel-Kälte-Gametogenese-Behandlung beruhen, oder ob diese Veränderungen nicht durch CAP selbst, sondern durch toxisch wirkende Abbauprodukte (ICAP; vergl. RAHAT et al., 1979) ausgelöst werden, wird kaum zu klären sein. Da aber nach 6 h erst geringe Mengen zersetzt sind (s. III 2 b),

Tab. 10: Vergleich der Werte für die Mitochondrienachsen des Chondrioms verschiedener Stadien von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Messungen an unterschiedlichen Mitochondriensegmenten der Modelle aus 60 bis 87 Serienschritten durch die jeweilige Gesamtzelle

Mitochondrienachsen in μm	lange Achse	kurze Achse	Messungen
t = 0 + 12 h CAP (Licht)	0,75 $\pm$ 0,34	0,16 $\pm$ 0,09	58
t = 0 + 6 h CAP (Licht)	0,90 $\pm$ 0,42	0,40 $\pm$ 0,24	23
t = 0 (vegetativer Zyklus)	0,93 $\pm$ 0,53	0,10 $\pm$ 0,05	23
t = 0 + 20 h (Dunkel-Kälte-Gametogenese)	1,51 $\pm$ 0,48	0,25 $\pm$ 0,10	12
t = 0 + 20 h CAP (Dunkel-Kälte-Gametogenese)	1,56 $\pm$ 0,65	0,50 $\pm$ 0,11	7

dürfte die oben erwähnte erste Alternative wahrscheinlicher sein.

Wie Achsenvermessungen an verschiedenen Mitochondriensegmenten zeigen (Tab. 10), bleiben die langen Achsen von t = 0 + 6 h CAP im Vergleich zu t = 0 konstant, während die kurzen Achsen eine etwa 4fache Verbreiterung zeigen. Bei t = 0 + 12 h CAP sind die langen Achsen verkürzt, die kurzen Achsen noch etwas verbreitert. Beides deutet auf eine Normalisierung der Mitochondriendurchmesser und eine Proliferation des Chondrioms in Richtung auf t = 6 des vegetativen Zyklus hin. Nach Dunkel-Kälte-Gametogenese sind mit und ohne CAP die langen Achsen gleichmäßig etwa 1,5fach verlängert; die kurzen Achsen von t = 0 + 20 h CAP zeigen jedoch eine zusätzliche Verbreiterung auf den doppelten Wert im Vergleich zu t = 0 + 20 h. Diese Verbreiterung der kurzen Achsen entspricht in etwa der von ZETTEL (persönliche Mitteilung) an *Chlamydomonas reinhardtii* nach Gentamycinbehandlung

gefundenen 2- bis 2,5fachen Vergrößerung des Durchmessers bei Megamitochondrien.

Ein Vergleich der Stabdiagramme der mitochondriellen Volumenrelationen (Abb. 37) zeigt, daß ausgehend von $t = 0$ (0,01 bis 1,47 % der Zelle) bei $t = 0 + 6$ h CAP die kleinsten, aber auch die größten Werte abgenommen haben (0,05 bis 1,26 % der Zelle); bei $t = 0 + 12$ h CAP sind dagegen kleine Volumina sehr häufig, während die größeren noch weniger oft vertreten sind (0,01 bis 0,84 % der Zelle). Nach Dunkel-Kälte-Gametogenese sind bei $t = 0 + 20$ h kleine Werte noch seltener zu finden als bei $t = 0 + 6$ h CAP im Licht, dagegen sind auch größere Volumina vorhanden (0,19 bis 1,66 % der Zelle); die größten Relationen treten dagegen erst mit CAP nach einer Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h CAP auf (0,09 bis 2,34 % der Zelle). Anhand dieser Stabdiagramme ist auch eine deutliche Zunahme der Mitochondrienzahl von $t = 0$ bis $t = 0 + 12$ h CAP im Licht bzw. ihre Abnahme von $t = 0$ bis $t = 0 + 20$ h CAP in Dunkelheit und Kälte erkennbar.

Die Einzelmitochondrien zeigen somit von $t = 0$ bis $t = 0 + 6$ h CAP eine 5fache Erhöhung der Volumenrelation des kleinsten in einer Zelle dieses Stadiums auftretenden Mitochondriums, um bei $t = 0 + 12$ h CAP wieder auf den ursprünglichen Wert abzusinken. Das größte in einer Zelle dieses Stadiums auftretende Mitochondrium nimmt dagegen erst etwa 1,2fach, dann nochmals 1,5fach ab.

Das kleinste in einer Zelle nach Dunkel-Kälte-Gametogenese bei $t = 0 + 20$ h auffindbare Mitochondrium zeigt eine 19fache Vergrößerung, um bei $t = 0 + 20$ h CAP wieder auf die Hälfte bzw. den 9fachen Wert von $t = 0$ abzufallen. Das größte Mitochondrium bei $t = 0 + 20$ h zeigt andererseits ein ca. 1,1-faches Anwachsen im Vergleich zu $t = 0$, das größte Mitochondrium bei $t = 0 + 20$ h CAP eine nochmalige Zunahme um den 1,4-fachen Wert bzw. um den 1,6fachen Wert im Vergleich zu $t = 0$.

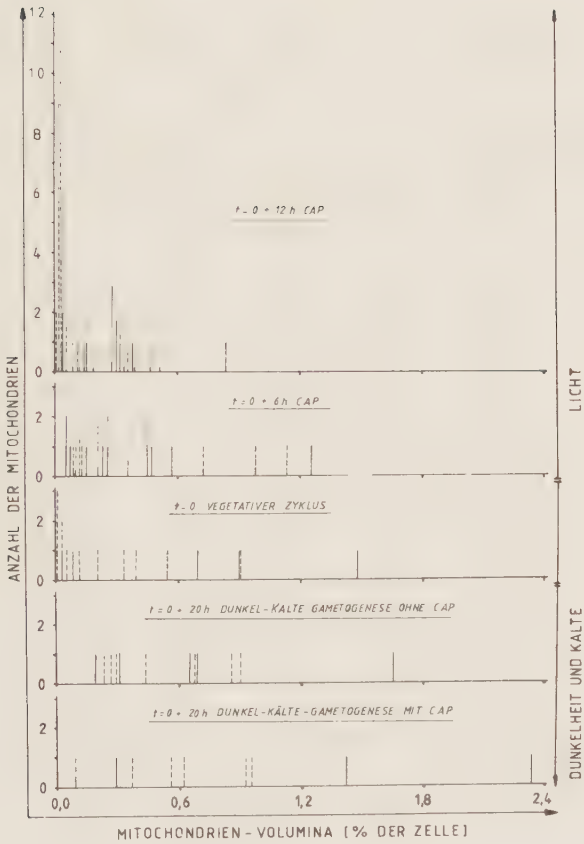


Abb. 37: Vergleich der Stabdiagramme (Mitochondrienzahl gegen Volumenrelation) von jeweils zwei Zellen (durchgezogene bzw. gestrichelte Linien) in verschiedenen Stadien von *Chlamydomonas reinhardtii* nach morphometrischen Auswertungen von insgesamt 10 Zellen mit zwischen 55 und 87 Serienschnitten pro Zelle

Der Mitochondrienbestand variiert jedoch ebenso wie in den unbehandelten Zellen, so daß nicht nur verschiedene Zellen unterschiedlich stark geschädigt sein können, sondern selbst die Mitochondrien in ein und derselben Zelle einen unterschiedlichen Schädigungsgrad zeigen. Ein solches Verhalten wurde bei ultrastrukturgeschädigten Zellen schon öfter beschrieben (vergl. ASANO et al., 1978; BAGGER-SJÖBÄCK und WERSÄLL, 1978; LUNGER und CLARK, 1979; PORTER et al., 1979). Diese Streuung darf besonders bei einem Vergleich der Werte von Einzelmitochondrien nicht unterschätzt werden.

Wie aus dem Säulendiagramm des gesamten Chondrioms ersichtlich wird (Abb. 38), ergibt sich für zwei ausgewertete Zellen ein ca. 1,4faches Anwachsen der Volumenrelationen von $t = 0$ bis $t = 0 + 6$ h CAP, um danach wieder abzufallen. Nach der Dunkel-Kälte-Gametogenese ist die Relation andererseits etwa 1,3fach angestiegen und wächst dann nochmals um den knapp 1,1fachen Wert bei $t = 0 + 20$ h CAP. Das Diagramm zeigt deutlich, daß auch der Kern diese Volumenveränderungen mitmacht; sogar derselbe Kurvenverlauf wird in etwa nachvollzogen. Eine wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Behandlung mit ultrastrukturschädigenden Wirkstoffen betrifft also sicher nie ein Organell allein; obwohl das in diesem Fall eingesetzte CAP als ausgesprochener Hemmstoff der Proteinsynthese an 70-S-Ribosomen gilt (vergl. allerdings I 2 a), wird auch der Kern eindeutig in Mitleidenschaft gezogen. Dies gilt ebenso für die Microbody-ähnlichen Cytosomen, die eine 1,7fache Volumenvergrößerung zwischen $t = 0$ und $t = 0 + 6$ h CAP bzw. eine 1,6fache Vergrößerung zwischen $t = 0 + 20$ h und $t = 0 + 20$ h CAP zeigen. Offenbar betrifft die Volumenvergrößerung der Microbody-Cytosomen immer nur die durch CAP geschädigten Zellen.

Die bereits erwähnte deutliche Zu- bzw. Abnahme der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle wird in Abb. 39 nochmals verdeutlicht. Die Zahl der unterscheidbaren mitochondriellen

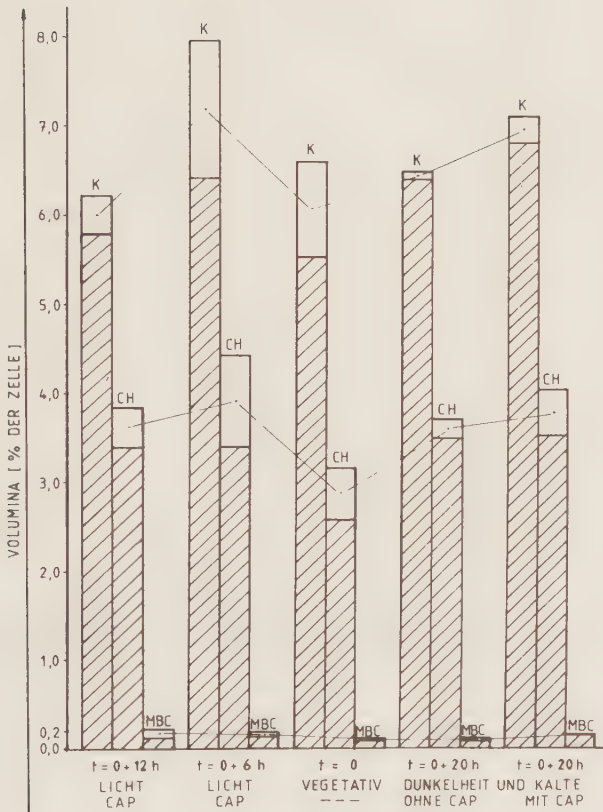


Abb. 38: Säulendiagramm zum Vergleich der prozentualen Volumenanteile von Kern (K), Chondriom (CH) und Microbody-ähnlichen Cytosomen (MBC) von jeweils zwei Zellen (schraffiert bzw. unschraffiert) in verschiedenen Stadien von *Chlamydomonas reinhardtii* nach morphometrischen Auswertungen von insgesamt 10 Zellen mit zwischen 55 und 87 Serienschnitten pro Zelle

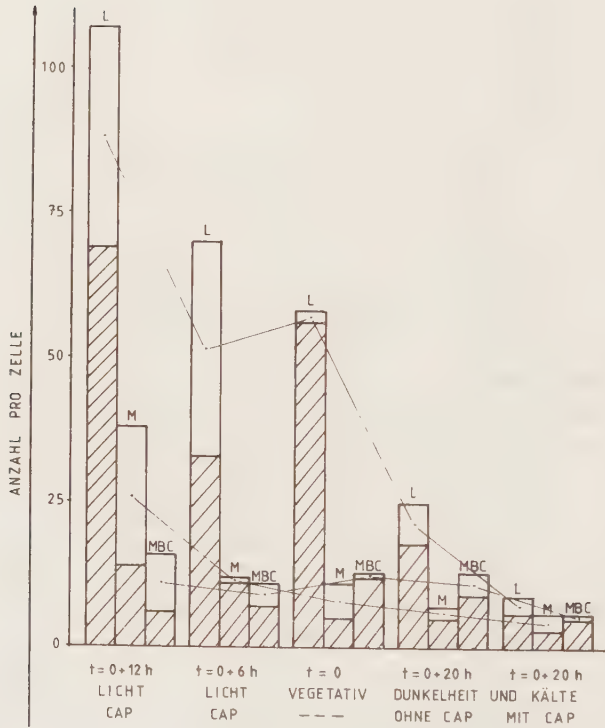


Abb. 39: Säulendiagramm zum Vergleich der pro Zelle enthaltenen Anzahl von Lobuli (L), Mitochondrien (M) und Microbody-ähnlichen Cytosomen (MBC) von jeweils zwei Zellen (schraffiert bzw. unschraffiert) in verschiedenen Stadien von *Chlamydomonas reinhardtii* nach morphometrischen Auswertungen von insgesamt 10 Zellen mit zwischen 55 und 87 Serienschritten pro Zelle

Untereinheiten pro Zelle ist dabei nicht eindeutig korreliert mit der Mitochondrienzahl. Dies liegt teilweise sicher an einer relativ hohen Streubreite in den einzelnen Zellen und der etwas subjektiven Einteilung der Lobuli; andererseits werden diese Substrukturen nach Dunkel-Kälte-Induktion aber auch weniger unterscheidbar und sind insbesondere nach CAP-Behandlung während der Gametogenese unter diesen Bedingungen bei $t = 0 + 20$ h CAP zu größeren Einheiten angeschwollen, so daß die hier stattfindende Abnahme tatsächlich erheblich schneller abläuft als die der Mitochondrien.

Interessant ist das Verhalten der Microbody-Cytosomen. Obwohl sie nach Applikation von CAP eine Volumenvergrößerung erfahren, nimmt ihre Anzahl pro Zelle dabei ab - dies entspricht genau den Verhältnissen bei den Mitochondrien! Betrachtet man diese Strukturen genauer, so fällt eine weitere Eigenart auf: In Kontrollzellen liegt das Verhältnis von freien zu in Mitochondriennähe befindlichen Microbody-Cytosomen annähernd bei 1:1 - in CAP-behandelten Zellen ändert es sich zugunsten der mitochondrienassoziierten Körper auf 1:3 bis 1:6, so daß teilweise sehr große Einheiten dicht an Mitochondrien gefunden werden.

Ähnlich strukturierte Körper wurden von WALNE (1967) nach Colchicinbehandlung von Chlamydomonas-Zellen ebenfalls in größerem Ausmaß in Mitochondriennähe gefunden und als Lipidkörper bezeichnet. SCHÖTZ et al. (1972) übernahmen diesen Ausdruck und vermuten, daß sie wie bei höheren Pflanzen von Sphärosomen abstammen könnten, die ihrerseits von den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums abgeschnürt werden. Damit dürften wiederum verwandtschaftliche Beziehungen zu den Microbodies bestehen, die nicht nur häufig in der Nähe des Endoplasmatischen Retikulums, sondern auch in engen Mitochondrienassoziationen gefunden werden (SILVERBERG und SAWA, 1974; POWELL, 1979; GAFFAL, persönliche Mitteilung).

Da die eindeutige Definierung elektronenoptisch erkennbarer Microbodies erst nach zusätzlicher histochemischer Identifizierung gesichert ist, die Diaminobenzidinreaktion zum Nachweis der enthaltenen Katalase bei *Chlamydomonas reinhardtii* jedoch negativ verläuft (SILVERBERG, 1975), wurde hier der Begriff "Microbody-Cytosomen" gewählt, um die enge ultrastrukturelle Beziehung zu den Microbodies zu verdeutlichen. Somit erscheint zwar sicher, daß es sich bei den hier beschriebenen Körpern nicht um Cytolysomen handelt, die in Fällen von Mitochondriendegenerationen häufig angetroffen werden, aber eine völlig andere Ultrastruktur zeigen (vergl. NOVIKOFF und ESSNER, 1962); die Natur dieser Strukturen bleibt jedoch ebenso wie die Art ihrer Beziehungen zu den mitochondriellen Umbaureaktionen nach wie vor ungeklärt.

b) Die dreidimensionale Struktur von Megamitochondrien

Die CAP-bedingten Veränderungen im Chondriom von *Chlamydomonas reinhardtii* lassen sich zusammenfassend folgendermaßen charakterisieren: Sowohl im Licht als auch nach Behandlung während einer Dunkel-Kälte-Gametogenese von Zellen des sensiblen Stadiums $t = 0$ kommt es zu einer Mitochondrienvergrößerung mit einer Verbreiterung der kurzen Mitochondrienachsen auf den ca. 4fachen Wert im Licht bzw. den etwa 2fachen Wert in Dunkelheit und Kälte. Die kleineren Mitochondrien erfahren dabei die stärkste Volumenvergrößerung im Vergleich zur Kontrolle, während das Gesamtchondriom nur auf den ca. 1,4fachen Wert im Licht bzw. den etwa 1,1fachen Wert in Dunkelheit und Kälte anwächst.

Im Gegensatz zur Kontrolle (Abb. 40, oben) werden nach 6stündiger Behandlung im Licht lokale Aufblähungen mit elektronenleerer Matrix oder auch verdichteter Matrix an anderen Stellen angetroffen; gleichzeitig wird die Mitochondrienproliferation

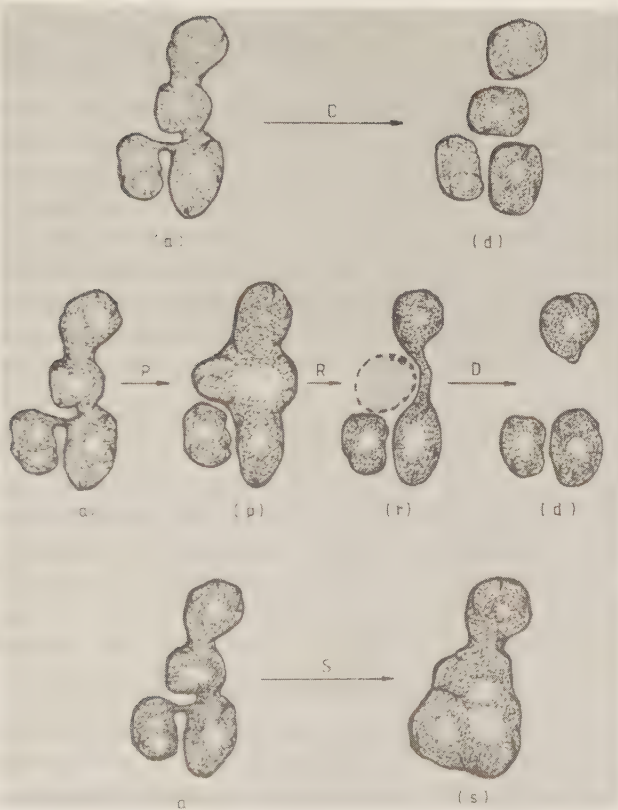


Abb. 40: Interpretationsversuch der Mitochondrienproliferation bei *Chlamydomonas reinhardtii* während der ersten 6 Lichtstunden (oben), bei CAP-Behandlung während der ersten 12 Lichtstunden (Mitte) und bei 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP (unten): Ohne CAP kommt es von $t = 0$ (a) bis $t = 6$ (d) zur Mitochondrien-teilung (D, Division), mit CAP zu einer lokalen lobulären Aufblähung (P, Puff) bei $t = 0 + 6$ h CAP (p); mit Hilfe eines Reparaturmechanismus (R, Repair) werden diese Stellen bis $t = 0 + 12$ h CAP (r) herausgeschnitten, so daß die Teilung verspätet einsetzt; bei einer Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP kommt es dagegen zur Anschwellung (S, Swell) der bei $t = 0$ gut unterscheidbaren Lobuli eines Mitochondrienaggregats und zur Bildung eines Agglomerats bei $t = 0 + 20$ h CAP (s)

unterdrückt. Diese Veränderungen sind im weiteren Behandlungsverlauf reparabel (Abb. 40, Mitte). Dagegen kommt es nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese mit CAP zu einer allgemeinen Anschwellung der Mitochondrien mit unveränderter Innenstruktur (Abb. 40, unten). Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle wird dabei reduziert. Diese Verknüpfung von Mitochondrienvergrößerung bei gleichzeitiger Abnahme der Mitochondrienzahl ist offenbar ein häufig beobachtbares Phänomen bei der Auswertung ultrastrukturgeschädigter Zellen (KIMBERG et al., 1968; BERLINER, 1975; SOHAL und BRIDGES, 1978; SICKO-GOAD und STOERMER, 1979; ZETTEL, persönliche Mitteilung).

Die bei den hier vorliegenden Untersuchungen feststellbare gleichzeitige Abnahme der Lobulierung wird dagegen vermutlich erst nach dreidimensionalen Rekonstruktionen sichtbar. Diese Delobulierung dürfte im An- und Zusammenschwellen der Lobuli zu größeren Einheiten begründet sein (Abb. 40, unten). Die Lobuli eines Mitochondrienaggregats (Abb. 40, a) sind noch mehr oder weniger deutlich voneinander abgegrenzt; nach ihrer Agglomeration sind sie jedoch nur mehr schwer unterscheidbar (Mitochondrienagglomerat; Abb. 40, s).

Bereits ohne CAP ist die Dunkel-Kälte-Gametogenese ein erster Schritt zur schlechteren Identifizierbarkeit der Lobuli, doch werden Agglomerate erst mit CAP eindeutig ausgebildet. Nach Behandlung im Licht sind dagegen nach wie vor Aggregate vorhanden. Bei Berücksichtigung der ursprünglichen Definition für Megamitochondrien (große Flächenanschnitte im zweidimensionalen Bild) sind daher nur die hier nach Dunkel-Kälte-Induktion mit CAP beschriebenen Agglomerate als solche pathologisch veränderten Mitochondrien aufzufassen; Megamitochondrien würden also weder durch Fusion kleinerer Mitochondrien entstehen noch durch das Nicht-Auseinanderweichen von größeren Einheiten, sondern durch eine Vermischung dieser beiden Prozesse bei der Agglomeration. Sie stellt offenbar einen Sonderfall des Phänomens der Membranfusion dar, der nach

WAKABAYASHI et al. (1978) eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Megamitochondrien zukommt.

Wie bereits diskutiert wurde, variiert das Ausmaß der zellulären Schädigung in weiten Bereichen sowohl von Zelle zu Zelle des gleichen Stadiums als auch innerhalb der Mitochondrienpopulation in ein und derselben Zelle. Das mittlere Volumen von Mitochondrien in behandelten Zellen liegt daher nur etwa 10 % über dem Mittel der Kontrollzellen, während es andererseits auch zu einer extremen Volumenvergrößerung von Megamitochondrien kommen kann - das größte Megamitochondrium in einer Zelle erreichte einen Wert von $1,53 \mu\text{m}^3$ oder 2,34 % des Zellvolumens bzw. ca. 60 % des Volumens des Chondrioms.

In die Unterteilung der großen Mitochondrien nach der in V 1 b vorgeschlagenen Mitochondrienklassifizierung sind Megamitochondrien (abgesehen von "Mini"-Formen) daher wie folgt einzubeziehen:

etwa $1 \mu\text{m}^3$ - Megamitochondrien.

Da Megamitochondrien relativ plump wirken (große Agglomerate) und damit im dreidimensionalen Bild ein völlig anderes Aussehen zeigen als die feingliedrigen und stark verästelten Riesenmitochondrien (große Aggregate), ist aufgrund ihrer Ausdehnung nur eine Lage im oberen Teil der Zelle zwischen Kern und Geißelbasis möglich - der untere und mittlere Teil der Zelle ist von Chloroplast und Kern erfüllt. Wie weitere Überlegungen zeigen, wird die Volumenrelation zur Zelle und vermutlich auch zu anderen Organellen bei einer Volumenvergrößerung des Chondrioms nicht in extreme Bereiche hinein überschritten werden können, wenn die Zelle noch einigermaßen lebensfähig bleiben soll. Die Größe eines Megamitochondriums ist damit limitiert; für eine Zellgröße bei $t = 0$ (also auch für $t = 0 + 20 \text{ h CAP}$) könnte mit etwa 4 % des Zellvolumens oder ca. $3 \mu\text{m}^3$ das

Maximum erreicht sein. Da andererseits ein einziges Megamitochondrium in einer Zelle aufgrund der Lagebeschränkungen (vergl. z. B. das Modell in Abb. 2) kaum vorstellbar ist, dürfte das in Abb. 35 vorgestellte größte Megamitochondrium möglicherweise auch von der Form her die größte bei *Chlamydomonas reinhardtii* überhaupt zu erzielende Ausdehnung besitzen.

Auf dem Einzelschnitt flächenmäßig sehr große Mitochondrienanschnitte können nach einigen weiteren Schnitten durch die Zelle relativ schnell normalen Dimensionen weichen. Zwar sind auch bei Untersuchungen an möglichst vielen Einzelschnitten durch verschiedene Zellen am zweidimensionalen Bild Veränderungen in den Achsenverhältnissen der Mitochondrienprofile feststellbar; in eine genaue Definition des Phänomens der Megamitochondrien ist jedoch das nach der Auswertung von Serienschnitten zu erhaltende dreidimensionale Bild einzubeziehen. Megamitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii* sollten dabei folgende Kriterien zeigen:

1. Mitochondrienflächen in mehreren aufeinanderfolgenden Einzelschnitten möglichst groß;
2. Formen nach dreidimensionaler Rekonstruktion relativ plump, keine Verzweigungen;
3. Delobulierung von Aggregaten zu Agglomeraten erkennbar;
4. Achsenverhältnisse der Mitochondrien verändert, Volumina und Volumenrelationen sehr hoch.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, wie leicht Ultrastruktur, Morphologie und Morphometrie der Mitochondrien zu beeinflussen sind. So besteht z. B. eine klare

Abhängigkeit vom Lebenszyklus oder der Art der Gameteninduktion; auch geänderte Umweltbedingungen wie Licht, Dunkelheit oder Kälte und der Einfluß von Außenfaktoren wie pH-Wert, Stickstoffentzug aus dem Medium oder die Zugabe eines Hemmstoffs lassen sensible Reaktionen des Chondrioms erwarten.

Möglicherweise sind die Mitochondrien aufgrund ihrer leicht beeinflussbaren Morphodynamik die am empfindlichsten auf äußere Umwelteinflüsse reagierenden Organellen einer Zelle, doch liegen letztlich noch keine Vorstellungen über die funktionelle Bedeutung dieses Formen- und Strukturwandels vor. Auch die Klärung der Fragen, inwieweit toxische Seiteneffekte nach Antibiotikabehandlung auf einer Veränderung der Mitochondrienstruktur beruhen (WEISBLUM und DAVIES, 1968; KROON und DE VRIES, 1970; ARNOLD, 1978) und ob der Hemmung der Mitochondrienproliferation nach Behandlung mit Cytostatika eine Rolle bei deren Wirkungsmechanismus zukommt (GRASSO et al., 1977; MIKLES-ROBERTSON et al., 1979), oder ob diese Effekte nur das ultrastrukturelle Ergebnis einer auf andere Weise erreichten Zellschädigung darstellen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu zellstadienspezifischen und chloramphenicolinduzierten Veränderungen der Morphologie der Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii* wurden dreidimensionale Rekonstruktionen und morphometrische Auswertungen anhand von Ultrastrukturuntersuchungen nach ultradünnen Serienschnitten durchgeführt.
2. Die Untersuchungen zum Mitochondrienverhalten im vegetativen Zyklus und nach Dunkel-Kälte-Gametogenese vervollständigen und ergänzen frühere Angaben von SCHÖTZ et al. (1972), GROBE und ARNOLD (1975), OSAFUNE et al. (1975), GROBE (1976), OSAFUNE et al. (1976) sowie GROBE und ARNOLD (1977); erstmalig wird die Veränderung der dreidimensionalen Mitochondrienstruktur nach Behandlung mit Chloramphenicol beschrieben.
3. Die zu Belichtungsbeginn relativ einfach gebauten Mitochondrien teilen sich im Verlauf der ersten 6 Lichtstunden in eine große Zahl von Organellen, die bis zur 9. Lichtstunde des synchronisierten vegetativen Zellzyklus zu vielfach verzweigten Riesenmitochondrien oder einem Netzwerk fusionieren, um danach wieder in kleinere Einheiten zu zerfallen. Das Chondriom in Zellen zu Belichtungsbeginn entspricht überraschenderweise in etwa dem von SCHÖTZ et al. (1972) beschriebenen Mitochondrieninventar von aus Asynchronkulturen induzierten Gameten.
4. Größere Mitochondrien sind nicht einfach siphonal gebaut, sondern deutlich in mitochondrielle Substrukturen untergliedert. Für diese kleinsten Bausteine eines Chondrioms, die als ovoide Mitochondrien auch frei auftreten können, häufig jedoch zu länglichen oder verzweigten Formen fusioniert sind, wird hier die Bezeichnung "Lobuli" vorgeschlagen.

5. Nach 20stündiger Dunkel-Kälte-Gametogenese von Zellen aus dem bei Belichtungsbeginn vorliegenden Stadium ist eine leichte Mitochondrienvergrößerung feststellbar, während der Mitochondrienbestand nach Induktion von Zellen aus der 9. Lichtstunde konstant bleibt. Ein zu diesem Zeitpunkt vorliegendes Mitochondriennetz befindet sich mehr in zentralen Zellbereichen, während das von GROBE und ARNOLD (1975) nach Lichtinduktion beschriebene Netzwerk peripher liegt und die Plastide umfaßt.
6. Bei Behandlung des Zellstadiums zu Lichtbeginn mit Chloramphenicol kommt es während der ersten 6 Lichtstunden zur Hemmung der Mitochondrienproliferation und lokalen Aufblähungen der Mitochondrien mit elektronenleeren oder an anderen Stellen verdichteten Matrixbereichen; diese Schäden sind im weiteren Behandlungsverlauf bis zu insgesamt 12 Lichtstunden reparabel.
7. Bei Behandlung desselben Stadiums mit Chloramphenicol während einer 20stündigen Dunkel-Kälte-Gametogenese erfahren die Mitochondrien dagegen bei unveränderter Innenstruktur eine umfassende Anschwellung und Delobulierung im gesamten Organell, wodurch Megamitochondrien gebildet werden können. Bei Behandlung von Zellen aus der 9. Lichtstunde während einer Dunkel-Kälte-Gametogenese bleibt das Chondriom andererseits unverändert.
8. Von einigen Zellstadien angefertigte Mitochondrienmodelle verdeutlichen das dreidimensionale Aussehen; morphometrische Auswertungen verschiedener Stadien erlauben eine volumenmäßige Klassifizierung der Mitochondrien.
9. Veränderungen im Chondriom von *Chlamydomonas reinhardtii* folgen bestimmten periodischen Tendenzen während des Lebenszyklus bzw. bei Chloramphenicolbehandlung, so daß die Mitochondrienpopulation eines definierten Stadiums

die ihm eigenen Charakteristika zeigt; es bestehen jedoch nicht nur Unterschiede im Mitochondrienbestand von Zellen in unterschiedlichen Stadien, sondern auch Variationen von einer Zelle zur anderen im gleichen Stadium und sogar zwischen den Mitochondrien in ein und derselben Zelle.

10. Wie die Ergebnisse zeigen, besitzen die Mitochondrien eine leicht beeinflussbare Morphodynamik, die möglicherweise dafür verantwortlich ist, daß diese Organellen die am empfindlichsten auf Umwelteinflüsse reagierenden Strukturen einer Zelle sind. Die Klärung der funktionellen Bedeutung dieser Umbaureaktionen bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADOUTTE, A., BALMEFRÉZOL, M., BEISSON, J., ANDRÉ, J.:
The effects of erythromycin and chloramphenicol on the ultrastructure of mitochondria in sensitive and resistant strains of *Paramecium*.
J. CELL BIOL. 54, 8-19 (1972)
2. AGAM, G., DJALDETTI, M.:
Inhibition of human platelet mitochondrial protein synthesis by chloramphenicol.
BIOMED. EXPRESS 27, 66-69 (1977)
3. ALBRING, M., RADSAK, K., RUMPELT, H., THOENES, W.:
Giant mitochondria. III. Cycloheximide dependent persistence of cuprizone-induced megamitochondria.
CYTOBIOLOGIE 8, 168-174 (1973a)
4. ALBRING, M., RADSAK, K., THOENES, W.:
Giant mitochondria. II. Induction of matrix enriched megamitochondria in mouse liver parenchymal cells by ethidium bromide.
VIRCHOWS ARCH. B CELL PATH. 14, 373-377 (1973b)
5. ALBRING, M., RADSAK, K., THOENES, W.:
Enhanced DNA synthesis in isolated megamitochondria.
FEBS LETT. 35, 4-6 (1973c)
6. ALBRING, M., RADSAK, K., THOENES, W.:
Chloramphenicol-induced giant hepatic mitochondria.
NATURWISSENSCHAFTEN 62, 43 (1975)
7. ALI, S. L.:
Separation and determination of the hydrolysis products of chloramphenicol in pharmaceutical preparations by

- high-performance liquid chromatography.
J. CHROMATOGR. 154, 103-105 (1978)
8. ANDERSON, K. M., BASS, B., SACLARIDES, T.:
Cycloheximide insensitive nuclear protein synthesis
partially suppressed by chloramphenicol: some possible
implications in the evolution of eukaryotes.
INT. J. BIOCHEM. 10, 523-527 (1979)
9. ARNOLD, C. G.:
Extranuclear heredity: the phylogenic origin of extra-
nuclear heredity.
FORTSCHR. BOT./PROGR. BOT. 39, 182-191 (1977)
10. ARNOLD, C. G.:
Zellschäden durch Antibiotika.
UMSCHAU 78, 480-481 (1978)
11. ARNOLD, C. G., BLANK, R.:
Three-dimensional structure of mitochondria and plastids
in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytoma papillatum*.
In: Proceedings in Endosymbiosis and Cell Research.
SCHWEMMLER, W., SCHENK, H., eds.
Berlin, New York: DE GRUYTER, in press
12. ARNOLD, C. G., GAFFAL, K. P.:
Extranucleäre Vererbung: Die Morphologie extranucleärer
Erbträger im Verlauf des Lebenszyklus.
FORTSCHR. BOT./PROGR. BOT. 41, 212-220 (1979a)
13. ARNOLD, C. G., GAFFAL, K. P.:
Die räumliche Struktur von Mitochondrien und Plastiden.
BIOLOGIE IN UNSERER ZEIT 9, 45-51 (1979b)

14. ARNOLD, C. G., SCHIMMER, O., SCHÖTZ, F., BATHELT, H.:
Die Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii*.
ARCH. MIKROBIOL. 81, 50-67 (1972)
15. ARNOLD, C. G., ZETTEL, H., LEIBOLD, H.:
Die Wirkung von Antibiotika auf die Feinstruktur von
Mitochondrien und Plastiden.
PLANTA MED. 33, 266-267 (1978)
16. ARTARI, A.:
Zur Physiologie der Chlamydomonaden. Versuche und Beob-
achtungen an *Chlamydomonas ehrenbergii* GOROSCH. und ver-
wandten Formen.
JB. WISS. BOT. 52, 410-466 (1913)
17. ASANO, M., WAKABAYASHI, T., ISHIKAWA, K., KISHIMOTO, H.:
Mechanism of the formation of megamitochondria by cop-
per-chelating agents. IV. Role of fusion phenomenon in
the cuprizone-induced megamitochondrial formation.
ACTA PATHOL. JPN. 28, 205-213 (1978)
18. ASHOUR, B., TRIBE, M., DANKS, S., WHITTAKER, P.:
Biochemical and ultrastructural studies on flight muscle
mitochondria from the blowfly *Calliphora erythrocephala*
following treatment by chloramphenicol and ethidium
bromide.
J. CELL SCI. 41, 291-306 (1980)
19. ATKINSON, A. W., JOHN, P. C. L., GUNNING, B. E. S.:
The growth and division of the single mitochondrion and
other organelles during the cell cycle of *Chlorella*,
studied by quantitative stereology and three-dimension-
al reconstruction.
PROTOPLASMA 81, 77-109 (1974)

20. BAGGER-SJÖBÄCK, D., WERSÄLL, J.:
Gentamycin-induced mitochondrial damage in inner ear sensory cells of the lizard *Calotes versicolor*.
ACTA OTO-LARYNGOL. 86, 35-51 (1978)
21. BEHN, W.:
Feinstrukturuntersuchungen zur Genlokalisierung einiger extrakaryotisch vererbter Merkmale bei Stämmen von *Chlamydomonas reinhardtii*.
Erlangen: Diss. 1973
22. BEHN, W., ARNOLD, C. G.:
Localization of extranuclear genes by investigations of the ultrastructure in *Chlamydomonas reinhardtii*.
ARCH. MIKROBIOL. 92, 85-90 (1973)
23. BEHN, W., ARNOLD, C. G.:
Die Wirkung von Streptomycin und Neamin auf die Chloroplasten- und Mitochondrienstruktur von *Chlamydomonas reinhardtii*.
PROTOPLASMA 82, 76-89 (1974a)
24. BEHN, W., ARNOLD, C. G.:
Unterschiedliche genetische Konstitution von Chloroplast und Mitochondrien bei antibiotikaabhängigen Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii*.
PROTOPLASMA 82, 91-101 (1974b)
25. BEN-SHAUL, Y., MARKUS, Y.:
Effects of chloramphenicol on growth, size distribution, chlorophyll synthesis and ultrastructure of *Euglena gracilis*.
J. CELL SCI. 4, 627-644 (1969)

26. BEREITER-HAHN, J.:
Intracellular motility of mitochondria: role of the inner compartment in migration and shape changes of mitochondria in XTH-cells.
J. CELL SCI. 30, 99-116 (1978)
27. BERGERON, M., GUERETTE, D., FORGET, J., THIERY, G.:
Three-dimensional characteristics of the mitochondria of the rat nephron.
KIDNEY INT. 17, 175-185 (1980)
28. BERLINER, J. A.:
Formation of enlarged mitochondria in a liver cell line in response to a synthetic glucocorticoid.
J. CELL BIOL. 64, 711-716 (1975)
29. BISHOP, N. I., SENGHER, H.:
Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus obliquus*.
In: Methods in Enzymology, Vol. XXIII, pp. 53-66.
SAN PIEDRO, A., ed.
New York: ACADEMIC PRESS 1971
30. BLANK, H.:
Die Wirkung von Lincomycin und Clindamycin auf Chloroplast und Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii*.
Erlangen: Zulassungsarb. 1976
31. BLANK, R., ARNOLD, C. G.:
Variety of mitochondrial shapes, sizes, and volumes in *Chlamydomonas reinhardtii*.
PROTOPLASMA, in press

32. BLANK, R., GROBE, B., ARNOLD, C.G.:
Time-sequence of nuclear and chloroplast fusions in the
zygote of *Chlamydomonas reinhardtii*.
PLANTA 138, 63-64 (1978)
33. BÖHME, H., HARTKE, K.:
Deutsches Arzneibuch (DAB 7): Kommentar.
Stuttgart: WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSANSTALT 1971
34. BRANDT, P.:
Evidence for regulative transactions between cytoplasmic
translation in *Euglena gracilis*. I. Quantitative changes
of the spectrum of plastidial proteins by chloramphenicol
or cycloheximid treatment.
Z. PFLANZENPHYSIOL. 94, 299-306 (1979)
35. BROMBERG, R.:
Mitochondrial fragmentation during germination in *Blasto-
cladiella emersonii*.
DEVELOP. BIOL. 36, 187-194 (1974)
36. BRUGEROLLE, G., MIGNOT, J. P.:
Distribution et organisation de l'ADN dans le complexe
kinétoplaste-mitochondrie chez un Bodonidé, protozoaire
kinétoplastidé; variation au cours du cycle cellulaire.
BIOL. CELL. 35, 111-114 (1979)
37. BUFF, W., ARNOLD, C. G.:
Untersuchungen an einer p-Aminobenzoesäure-Mangelmutante
von *Chlamydomonas reinhardtii*: Chloramphenicol als p-Ami-
nobenzoesäure-Ersatz.
ARCH. MIKROBIOL. 75, 304-311 (1971)
38. CAHEN, D., MALKIN, S., OHAD, I.:
Development of photosystem II activity in *Chlamydomonas*

reinhardi mutants. Insertion of photosystem II units into inactive preexisting membranes versus continuous formation of new photosynthetic membranes.

PLANT PHYSIOL. 60, 845-849 (1977)

39. CALVAYRAC, R., BERTAUX, O., LEFORT-TRAN, M., VALENCIA, R.:
Généralisation du cycle mitochondrial chez *Euglena gracilis* Z. en cultures synchrones, hétérotrophe et phototrophe.

PROTOPLASMA 80, 355-370 (1974)

40. CALVAYRAC, R., BUTOW, R. A.:
Action de l'antimycine A sur la respiration et la structure des mitochondries d'*Euglena gracilis* Z.
ARCH. MIKROBIOL. 80, 62-69 (1971)

41. CALVAYRAC, R., BUTOW, R. A., LEFORT-TRAN, M.:
Cyclic replication of DNA and changes in mitochondrial morphology during the cell cycle of *Euglena gracilis* (Z).
EXP. CELL RES. 71, 422-432 (1972)

42. CALVAYRAC, R., VAN LENTE, F., BUTOW, R. A.:
Euglena gracilis: formation of giant mitochondria.
SCIENCE 173, 252-254 (1971)

43. CHEVREMONT, M.:
Les chondriosomes.
ARCH. BIOL. 63, 109-111 (1953)

44. CIENKOWSKY, L.:
Ueber einige chlorophyllhaltige *Gloeocapsen*.
BOT. ZTG. 23, 21-27 (1865)

45. COTTRELL, S. F., AVERS, C. J.:
Evidence of mitochondrial synchrony in synchronous cell

cultures of yeast.

BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 38, 973-980 (1970)

46. CURGY, J. J., IFTODE, F., PERASSO, R., ANDRÉ, J.:
Croissance des cultures et morphologie des mitochondries
chez des mutants à hérédité cytoplasmique, résistants
au chloramphénicol, de *Tetrahymena pyriformis*.
BIOL. CELL. 37, 51-60 (1980)

47. CZYGAN, F. C.:
Untersuchungen über die Wirkung von Chloramphenicol auf
den Auf- und Abbau der Pigmente einiger Grünalgen.
ARCH. MIKROBIOL. 47, 251-259 (1964a)

48. CZYGAN, F. C.:
Über die Wirkung von Chloramphenicol auf Wachstum und
das Nitrat reduzierende Enzymsystem von Grünalgen.
NATURWISSENSCHAFTEN 51, 244 (1964b)

49. CZYGAN, F. C.:
Untersuchungen über den Abbau von Chloramphenicol durch
Grünalgen.
NATURWISSENSCHAFTEN 51, 541-542 (1964c)

50. DALLMAN, P. R., GOODMAN, J. R.:
Enlargement of mitochondrial compartment in iron and
copper deficiency.
BLOOD 35, 496-505 (1970)

51. DAVID, H.:
Quantitative and qualitative changes in the mitochondria
in hepatocytes during postnatal development of male rats.
EXP. PATHOL. 17, 359-373 (1979)

52. DAVISON, M. T., DOWNIE, J. A., GARLAND, P. B.:
Giant mitochondria in iron- or copper-deficient *Candida utilis*.
BIOCHEM. J. 129, 46-47p (1972)
53. DAVISON, M. T., GARLAND, P. B.:
Mitochondrial structure studied by high voltage electron microscopy of thick sections of *Candida utilis*.
J. GEN. MICROBIOL. 91, 127-138 (1975)
54. DILL, O.:
Die Gattung *Chlamydomonas* und ihre nächsten Verwandten.
JB. WISS. BOT. 28, 323-358 (1895)
55. DRON, M., ROBREAU, G., LE GAL, Y.:
Action inhibitrice des histones exogènes sur la croissance cellulaire et sur la synthèse d'ADN chez *Chlamydomonas reinhardtii*.
C. R. ACAD. SCI. SER. D 286, 149-152 (1978)
56. ELLIOTT, A. M., BAK, I.:
The fate of mitochondria during aging in *Tetrahymena pyriformis*.
J. CELL BIOL. 20, 113-129 (1964)
57. ELLIS, R. J.:
Chloramphenicol and uptake of salts in plants.
NATURE 200, 596-597 (1963)
58. ETTL, H.:
Relation of mitochondria to the kinetic apparatus in the genus *Chlamydomonas*.
In: Annual Reports of the Algological Laboratory Trěboň

for 1969, pp. 38-42.

NEČAS, J., LKOTSKÝ, O., eds.

Tréboň: 1970

59. Ettl, H.:

Die Gattung Chlamydomonas EHRENBURG.

NOVA HEDWIGIA BEIH. 49.

Vaduz: GANTNER 1976

60. EVANS, D. A., LLOYD, D.:

The effect of chloramphenicol on the mitochondria of
Polytomella caeca.

BIOCHEM. J. 103, 22p (1967)

61. FALK, M., ZENGEL, K.:

Untersuchungen zur Zersetzungskinetik von Chloramphenicol
in wässriger Lösung.

PHARMAZIE 33, 381-382 (1978)

62. FINK, T. J., GUMP, D. W.:

Chloramphenicol: An inpatient study of use and abuse.

J. INFECT. DIS. 138, 690-694 (1978)

63. FISCHER, B.:

Morphometrische Bestimmung der Zellkonstituenten von
Chlamydomonas reinhardtii DANGEARD während eines Entwicklungszyklus.

Göttingen: Diss. 1969

64. FOWLER, B. A., WOODS, J. S.:

The effects of prolonged oral arsenate exposure on liver
mitochondria of mice: morphometric and biochemical
studies.

TOXICOL. APPL. PHARMACOL. 50, 177-187 (1979)

65. FOWLER, B. A., WOODS, J. S., SCHILLER, C. M.:
Studies of hepatic mitochondrial structure and function.
Morphometric and biochemical evaluation of in vivo per-
turbation by arsenate.
LAB. INVEST. 41, 313-320 (1979)
66. FRANK, T.:
Cultur und chemische Reizerscheinungen der Chlamydomo-
nas tingens.
BOT. ZTG. 62, 153-188 (1904)
67. FRÉDÉRIC, J.:
Recherches cytologiques sur le chondriome normal ou
soumis à l'experimentation dans des cellules vivantes
cultivées in vitro.
ARCH. BIOL. 69, 167-349 (1958)
68. FREEMAN, K. B.:
Effects of chloramphenicol and its isomers and analogues
on the mitochondrial respiratory chain.
CAN. J. BIOCHEM. 48, 469-478 (1970a)
69. FREEMAN, K. B.:
Inhibition of mitochondrial and bacterial protein syn-
thesis by choramphenicol.
CAN. J. BIOCHEM. 48, 479-485 (1970b)
70. GAFFAL, K. P., KREUTZER, D.:
Mitochondria of Polytoma papillatum at two different
stages of vegetative cell cycle.
PROTOPLASMA 91, 167-177 (1977)
71. GAFFAL, K. P., SCHNEIDER, G. J.:
The changes in ultrastructure during fertilization of

the colourless flagellate *Polytoma papillatum* with special reference to the configurational changes of their mitochondria.

CYTOBIOLOGIE 18, 161-173 (1978)

72. GAFFAL, K. P., SCHNEIDER, G. J.:

Numerical, morphological, and topographical heterogeneity of the chondriome during the vegetative life cycle of *Polytoma papillatum*.

J. CELL SCI., in press

73. GERCKE, H.:

Die Wirkung von Nalidixinsäure und 4'-6-Diamidino-2-phenylindol auf die einzelligen Algen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Polytoma papillatum*.

Erlangen: Diss. 1979

74. GHADIALLY, F. N., SKINNIDER, L. F.:

Giant mitochondria in erythroleukaemia.

J. PATHOL. 114, 113-117 (1974)

75. GOH, K. O.:

Chloramphenicol and chromosomal morphology.

J. MED. 10, 159-166 (1979)

76. GOODENOUGH, U. W.:

The effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on chloroplast structure and function in wild-type *Chlamydomonas reinhardtii*.

J. CELL BIOL. 50, 35-49 (1971)

77. GOODENOUGH, U. W., LEVINE, R. P.:

The effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the recovery of chloroplast ribosomes, membrane or-

ganization, and photosynthetic electron transport in the ac-20 strain of *Chlamydomonas reinhardtii*.

J. CELL BIOL. 50, 50-62 (1971)

78. GOODENOUGH, U. W., TOGASAKI, R. K., PASZEWSKI, A.,
LEVINE, R. P.:
Inhibition of chloroplast ribosome formation by gene mutation in *Chlamydomonas reinhardtii*.
In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts, pp. 224-234.
BOARDMAN, N. K., LINNANE, A. W., SMILLIE, R. S., eds.
Amsterdam, London: NORTH-HOLLAND PUBLICATION COMPANY 1971
79. GRANT, P. G., COOPERMAN, B. S., STRYCHARZ, W. A.:
On the mechanism of chloramphenicol-induced changes in the photoinduced affinity labeling of *Escherichia coli* ribosomes by puromycin. Evidence for puromycin and chloramphenicol sites on the 30 S subunit.
BIOCHEMISTRY 18, 2154-2160 (1979)
80. GRASSO, R. J., MOORE, N. A., BOLER, R. K., JOHNSON, C. E.:
Increased volumes of mitochondria and granular endoplasmic reticulum in rat glioma cells treated with anti-tumor agents.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 155, 219-224 (1977)
81. GROBE, B.:
Untersuchungen zum Mitochondrienverhalten in der Zygote von *Chlamydomonas reinhardtii*.
Erlangen: Diss. 1976
82. GROBE, B., ARNOLD, C. G.:
Evidence of a large, ramified mitochondrion in *Chlamy-*

domonas reinhardii.

PROTOPLASMA 86, 291-294 (1975)

83. GROBE, B., ARNOLD, C. G.:

The behaviour of mitochondria in the zygote of *Chlamydomonas reinhardii*.

PROTOPLASMA 93, 357-361 (1977)

84. HALLMANN, L.:

Klinische Chemie und Mikroskopie.

Stuttgart: THIEME 1966

85. HAUPTMANN, E.:

Versuche zur Synchronisierung bei *Chlamydomonas reinhardii*.

Erlangen: Zulassungsarb. 1980

86. HEYWOOD, P.:

Evidence from serial sections that some cells contain large numbers of mitochondria.

J. CELL SCI. 26, 1-8 (1977)

87. HILL, G. L., ANDERSON, W. A.:

Effects of acriflavine on the mitochondria and kinetoplast of *Crithidia fasciculata*. Correlation of fine structure changes with decreased mitochondrial enzyme activity.

J. CELL BIOL. 41, 547-561 (1969)

88. HOFFMANN, H. P., AVERS, C. J.:

Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell.

SCIENCE 181, 749-751 (1973)

89. HOLLANDE, A.:
Étude cytologique et biologique de quelques flagellés
libres. Volvocales, Cryptomonadines, Eugléniens, Proto-
mastigines.
ARCH. ZOOL. EXP. GEN. 83, 1-268 (1942)
90. HONEYCUTT, R. C., MARGULIES, M. M.:
Control of ribosome content, gamete formation and amino
acid uptake in wild type and arg-1 *Chlamydomonas rein-*
hardtii.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 281, 399-405 (1972)
91. HONEYCUTT, R. C., MARGULIES, M. M.:
Protein synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*.
J. BIOL. CHEM. 248, 6145-6153 (1973)
92. HOOBER, J. K., BLOBEL, G.:
Characterization of the chloroplastic and cytoplasmic
ribosomes of *Chlamydomonas reinhardtii*.
J. MOL. BIOL. 41, 121-138 (1969)
93. HOWELL, N., ZUICHES, C. A., MUNKRES, K. D.:
Mitochondrial biogenesis in *Neurospora crassa*. I. An
ultrastructural and biochemical investigation of the
effects of anaerobiosis and chloramphenicol inhibition.
J. CELL BIOL. 50, 721-736 (1971)
94. HOWELL, S. H., BLASCHKO, W. J., DREW, C. M.:
Inhibitor effects during the cell cycle in *Chlamydomo-*
nas reinhardtii. Determination of transition points in
asynchronous cultures.
J. CELL BIOL. 67, 126-135 (1975)

95. HUDOCK, G. A., MCLEOD, G. C., MORAVKOVA-KIELY, J.,
LEVINE, R. P.:
The relation of oxygen evolution to chlorophyll and
protein synthesis in a mutant strain of *Chlamydomonas*
reinhardi.
PLANT PHYSIOL. 39, 898-903 (1964)
96. HUISMAN, J. G., TOUW, I., LIEBREGTS, P., BERNARDS, A.:
Biosynthesis of ferredoxins in *Chlamydomonas rein-*
hardii.
PLANTA 145, 351-356 (1979)
97. HUTNER, S. H., PROVASOLI, L., SCHATZ, A., HASKINS, C. P.:
Some approaches to the study of the role of metals in the
metabolism of microorganisms.
PROC. AMER. PHIL. SOC. 94, 152-170 (1950)
98. IPPEN, H.:
Lokale Chloramphenicol-Anwendung.
DEUT. MED. WOCHENSCHR. 103, 239 (1978)
99. ISHIURA, M.:
Gametogenesis of *Chlamydomonas* in the dark.
PLANT CELL PHYSIOL. 17, 1141-1150 (1976)
100. ISHIURA, M., IWASA, K.:
Gametogenesis in *Chlamydomonas*. I. Effect of light on
the induction of sexuality.
PLANT CELL PHYSIOL. 14, 911-921 (1973a)
101. ISHIURA, M., IWASA, K.:
Gametogenesis in *Chlamydomonas*. II. Effect of cyclo-
heximide on the induction of sexuality.
PLANT CELL PHYSIOL. 14, 923-933 (1973b)

102. ISHIURA, M., IWASA, K.:
Gametogenesis in *Chlamydomonas*. III. Daily fluctuation of sex-competence.
PLANT CELL PHYSIOL. 14, 935-939 (1973c)
103. JACOBSON, B. S., SALMON, R. J., LANSKY, L. L.:
Antimitotic effects of chloramphenicol and other inhibitory agents in *Chlamydomonas*.
EXP. CELL RES. 36, 1-13 (1964)
104. JEON, K. W., HAH, J. C.:
Effect of chloramphenicol on bacterial endosymbiotes in a strain of *Amoeba proteus*.
J. PROTOZOOLOGY. 24, 289-293 (1977)
105. KELLERMAN, G. M., BIGGS, D. R., LINNANE, A. W.:
Biogenesis of mitochondria. XI. A comparison of the effects of growth-limiting oxygen tension, intercalating agents, and antibiotics on the obligate aerobe *Candida parapsilosis*.
J. CELL BIOL. 42, 378-391 (1969)
106. KEYHANI, E.:
Morphological changes in yeast cell mitochondria grown at various copper concentrations.
EXP. CELL RES. 81, 73-78 (1973)
107. KIMBERG, D. V., LOEB, J. N.:
Effects of cortisone administration on rat liver mitochondria.
J. CELL BIOL. 55, 635-643 (1972)
108. KIMBERG, D. V., LOUD, A. V., WIENER, J.:
Cortisone-induced alterations in mitochondrial function

and structure.

J. CELL BIOL. 37, 63-79 (1968)

109. KING, M. E., GODMAN, G. C., KING, D. W.:
Respiratory enzymes and mitochondrial morphology of
HELA and L cells treated with chloramphenicol and
ethidium bromide.
J. CELL BIOL. 53, 127-142 (1972)
110. KIRSCHSTEIN, M.:
Bestimmung der PS II und PS I getriebenen Photophos-
phorylierungskapazität mit Hilfe der ATP-Pool-Messun-
gen über den Entwicklungszyklus von Chlamydomonas
reinhardtii.
Marburg: Diss. 1978
111. KISLEV, N., SPOLSKY, C. M., EISENSTADT, J. M.:
Effect of chloramphenicol on the ultrastructure of
mitochondria in sensitive and resistant strains of
HELA.
J. CELL BIOL. 57, 571-579 (1973)
112. KOLB-BACHOFEN, V., VOGELL, W.:
Mitochondrial proliferation in synchronized cells of
Tetrahymena pyriformis.
EXP. CELL RES. 94, 95-105 (1975)
113. KRAUS, B., CAIN, H.:
Mitochondrienveränderungen des Tubulusepithels bei
Wistarratten mit spontaner Nephropathie.
VIRCHOWS ARCH. B CELL PATH. 19, 179-190 (1975)
114. KRAUS, B., CAIN, H.:
Giant mitochondria in the human myocardium - morpho-

genesis and fate.

VIRCHOWS ARCH. B CELL PATH. 33, 77-90 (1980)

115. KROON, A. M., DE VRIES, H.:

The effect of chloramphenicol on the biogenesis of mitochondria in rat liver in vivo.

FEBS LETT. 3, 208-210 (1969)

116. KROON, A. M., DE VRIES, H.:

Antibiotics: A tool in the search for the degree of autonomy of mitochondria in higher animals.

SYMP. SOC. EXP. BIOL. 24, 181-199 (1970)

117. KUHL, A., LORENZEN, H.:

Handling and culturing of Chlorella.

In: Methods in Cell Physiology, Vol. I, pp. 159-187.

PRESCOTT, D. M., ed.

New York: ACADEMIC PRESS 1964

118. KUROIWA, T., HIZUME, M., KAWANO, S.:

Studies on mitochondrial structure and function in Physarum polycephalum. IV. Mitochondrial division cycle.

CYTOLOGIA 43, 119-136 (1978)

119. KUROIWA, T., KUROIWA, H.:

Inhibition of Physarum mitochondrial division by cytocholasin B.

EXPERIENTIA 36, 193-194 (1980)

120. KUROIWA, T., TAKAHASHI, K.:

Induction of mitochondrial migration in the slime mould Physarum polycephalum.

PLANT CELL PHYSIOL. 19, 1561-1564 (1978)

121. KUROIWA, T., TAKAHASHI, K.:
Studies of mitochondrial migration in *Physarum polycephalum*. I. Reversible induction of mitochondrial migration and its inhibition by cytocholasin B.
PLANT CELL PHYSIOL. 21, 65-74 (1980)
122. LAWRENCE, C. W., DAVIES, D. R.:
The mechanism of recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. The influence of inhibitors of protein synthesis on intergenic recombination.
MUTAT. RES. 4, 137-146 (1967)
123. LEDOIGHT, G., CALVAYRAC, R., ORCIVAL-LAFONT, A. M., PINEAU, B.:
Comparaison, à la lumière et à l'obscurité, des synthèses spécifiques d'ARN chez *Euglena gracilis* Z en cultures synchrones sur milieu lactate et étude du chondriome.
PLANTA 103, 254-262 (1972)
124. LEFEBVRE, P. A., NORDSTROM, S. A., MOULDER, J. E., ROSENBAUM, J. L.:
Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. IV. Effects of flagellar detachment, regeneration, and resorption on the induction of flagellar protein synthesis.
J. CELL BIOL. 78, 8-27 (1978)
125. LEFORT-TRAN, M.:
Mitochondries et chloroplastes chez *Euglena* en culture synchrone.
COLL. INT. C. N. R. S. 240, 297-308 (1975)
126. LEHNINGER, A. L.:
Biochemie.
Weinheim: VERLAG CHEMIE 1977

127. LEVINE, R. P., EBERSOLD, W. T.:
The genetics and cytology of *Chlamydomonas*.
ANNU. REV. MICROBIOL. 14, 197-216 (1960)
128. LIEN, T., KNUTSEN, G.:
Synchronous growth of *Chlamydomonas reinhardtii*
(Chlorophyceae): A review of optimal conditions.
J. PHYCOL. 15, 191-200 (1979)
129. LLOYD, D., EVANS, D. A., VENABLES, S. E.:
The effect of chloramphenicol on growth and mitochondrial function of the flagellate *Polytomella caeca*.
J. GEN. MICROBIOL. 61, 33-41 (1970)
130. LOPPES, R.:
Damage induced by methyl-methanesulfonate (MMS) in
Chlamydomonas reinhardtii.
Z. VERERBUNGSL. 98, 193-202 (1966)
131. LOPPES, R.:
A new class of arginine-requiring mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*.
MOL. GEN. GENET. 104, 172-177 (1969)
132. LORENZEN, H.:
Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender *Chlorella* bei langfristig intermittierender Belichtung.
FLORA 147, 382-404 (1959)
133. LORENZEN, H.:
Das Verhalten synchroner Kulturen von *Chlorella pyrenoidosa* an der oberen Temperaturgrenze des Wachstums.
VORTR. GESAMTGEW. BOT. 1, 231-238 (1962)

134. LUCKSCH, I.:
Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Chlamydomonaden.
BOT. CENTRALBL. BEIH. 50, 64-94 (1933)
135. LUNGER, P. D., CLARK, H. F.:
Morphological effects of prolonged chloramphenicol and ethidium bromide exposure on riper spleen mitochondria.
J. SUBMICR. CYTOL. 11, 1-12 (1979)
136. MACDONALD, I. R., BACON, J. S. D., VAUGHAN, D., ELLIS, R. J.:
The relation between ion absorption and protein synthesis in beet discs.
J. EXP. BOT. 17, 822-837 (1966)
137. MALEC, J., KORNACKO, L., WOJNAROWSKA, M.:
Protein and nucleic acid synthesis in isolated leukocyte nuclei and some evidence for the production of antibacterial protein.
EXP. CELL RES. 34, 188-191 (1964)
138. MARTELO, O. J., MANYAN, D. R., SMITH, U. S., YUNIS, A. A.:
Chloramphenicol and bone marrow mitochondria.
J. LAB. CLIN. MED. 74, 927-940 (1969)
139. MATAGNE, R. F., DELTOUR, R., LEDOUX, L.:
Somatic fusion between cell wall mutants of Chlamydomonas reinhardtii.
NATURE 278, 344-346 (1979)
140. MAY, R.:
Morphologisch veränderte Mitochondrien in Hefeprot-

plasten.

Z. ALLG. MIKROBIOL. 18, 741-746 (1978)

141. MAZZOCCHI, G., NERI, G., ROBBA, C., BELLONI, A. S.,
NUSSDORFER, G. G.:

Investigations on the turnover of adrenocortical
mitochondria. X. A correlated biochemical and stereo-
logical study of the effects of chronic treatment
with chloramphenicol on the mitochondria of the rat
zona fasciculata.

AMER. J. ANAT. 153, 67-80 (1978)

142. MCGILL, M., HSU, T. C., BRINKLEY, B. R.:

Electron-dense structures in mitochondria induced by
short-term ethidium bromide treatment.

J. CELL BIOL. 59, 260-265 (1973)

143. MEVES, F.:

Die Chondriosomen als Träger erblicher Anlagen. Cyto-
logische Studien am Hühnerembryo.

ARCH. MIKROSK. ANAT. 72, 816-867 (1908)

144. MEVES, F.:

Über das Verhalten des plastematischen Bestandteiles
des Spermiums bei der Befruchtung des Eies von
Phalluria manillota.

ARCH. MIKROSK. ANAT. 85, 215-260 (1913)

145. MIHARA, S., HASE, E.:

Studies on the vegetative life cycle of *Chlamydomonas*
reinhardi DANGEARD in synchronous culture. I. Some
characteristics of the cell cycle.

PLANT CELL PHYSIOL. 12, 225-236 (1971a)

146. MIHARA, S., HASE, E.:

Studies on the vegetative life cycle of *Chlamydomonas*

reinhardi DANGEARD in synchronous culture. II. Effects of chloramphenicol and cycloheximide on the length of cell cycle.

PLANT CELL PHYSIOL. 12, 237-241 (1971b)

147. MIKLES-ROBERTSON, F., FEUERSTEIN, B., DAVE, C.,
PORTER, C. W.:

The generality of methylglyoxal-bis(guanyldrazone)-induced mitochondrial damage and the dependence of this effect on cell proliferation.

CANCER RES. 39, 1919-1926 (1979)

148. MIYAKAWA, Y., KOMANO, T., MARUYAMA, Y.:

Cell-cycle-specific inhibition of septum formation and cell division in synchronized cells of *Bacillus subtilis*.

J. BACTERIOL. 141, 502-507 (1980)

149. MORRIS, I.:

Some effects of chloramphenicol on the metabolism of *Chlorella*. I. The effect on protein, polysaccharide and nucleic acid synthesis.

ARCH. MIKROBIOL. 54, 160-168 (1966)

150. NEUMANN, D., PARTHIER, B.:

Effects of nalidixic acid, chloramphenicol, cycloheximide, and anisomycin on structure and development of plastids and mitochondria in greening *Euglena gracilis*.

EXP. CELL RES. 81, 255-268 (1973)

151. NIJHOF, W., WIERENGA, P. K.:

On the effects of thiamphenicol and chloramphenicol on nucleic acid and protein synthesis in rabbit bone marrow cells in vivo and in vitro.

EXPERIENTIA 35, 686-688 (1979)

152. NOVIKOFF, A. B., ESSNER, E.:
Cytolysomes and mitochondrial degeneration.
J. CELL BIOL. 15, 140-146 (1962)

153. NUSSDORFER, G. G., MAZZOCCHI, G., ROBBA, C., COSTA, L.,
REBUFFAT, P.:
Investigations on the turnover of adrenocortical mitochondria. XIII. Effect of chronic treatment with chloramphenicol on the growth maintenance of the rat zona reticularis mitochondria.
J. SUBMICR. CYTOL. 11, 325-333 (1979)

154. OLIVEIRA, L.:
Changes in the ultrastructure of mitochondria of roots of Triticale subjected to anaerobiosis.
PROTOPLASMA 91, 267-280 (1977)

155. OSAFUNE, T.:
Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* (Z) in synchronous culture.
J. ELECTRON MICROSC. 22, 51-61 (1973)

156. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardi* DANGEARD in synchronous culture. I. Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, specially in formation of giant mitochondria.
PLANT CELL PHYSIOL. 13, 211-227 (1972a)

157. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardi* DANGEARD in synchronous culture. II. Association of mitochondria and

the chloroplast at an early developmental stage.

PLANT CELL PHYSIOL. 13, 981-989 (1972b)

158. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. I. Some characteristics of changes in the morphology of mitochondria and oxygen-uptake activity of cells.
PLANT CELL PHYSIOL. 16, 313-326 (1975a)
159. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. II. Modes of division of giant mitochondria.
J. ELECTRON MICROSC. 24, 33-39 (1975b)
160. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* DANGEARD in synchronous culture. III. Three-dimensional structures of mitochondria in the cells at intermediate stages of the growth phase of the cell cycle.
J. ELECTRON MICROSC. 24, 247-252 (1975c)
161. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. III. Three-dimensional structures of mitochondria after division of giant forms.
J. ELECTRON MICROSC. 24, 283-286 (1975d)
162. OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E., OHKURO, I.:
Electron microscope studies of the vegetative cellular

- life cycle of *Chlamydomonas reinhardi* DANGEARD in synchronous culture. IV. Mitochondria in dividing cells. J. ELECTRON MICROSC. 25, 261-270 (1976)
163. PAMBOR, L.:
Development of mitochondria in dormant and germinating sporangiospores of *Phycomyces blakesleeana*. MICROBIOS LETT. 8, 143-153 (1979)
164. PELLEGRINI, M., PELLEGRINI, L.:
Continuité mitochondriale et discontinuité plastidale chez l'*Euglena gracilis* Z.
C. R. ACAD. SCI. SER. D 282, 357-360 (1976)
165. PFAU, J., WERTHMÜLLER, K., SENGER, H.:
Permanent automatic synchronization of microalgae achieved by photoelectrically controlled dilution. ARCH. MIKROBIOL. 75, 338-345 (1971)
166. PIFFARETTI, J. C., FROMENT, Y.:
Binding of chloramphenicol and its acetylated derivatives to *Escherichia coli* ribosomal subunits. CHEMOTHERAPY 24, 24-28 (1978)
167. PIRSON, A.:
Synchrony, synchronization and cell cycles. COLL. INT. C. N. R. S. 240, 19-24 (1975)
168. PORTER, C. W., MIKLES-ROBERTSON, F., KRAMER, D., DAVE, C.:
Correlation of ultrastructural and functional damage to mitochondria of ascites L 1210 cells treated in vivo with methylglyoxal-bis(guanylhyazone) or ethidium bromide. CANCER RES. 39, 2414-2421 (1979)

169. POWELL, M. J.:
The structure of microbodies and their associations
with other organelles in zoosporangia of *Entophlyctis
variabilis*.
PROTOPLASMA 98, 177-198 (1979)
170. RAHAT, M., ZELDES, D., REICH, V.:
Photoproducts of chloramphenicol: their cytotoxic
effects on *Hydra viridis* and its symbiotic algae.
COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 63C, 27-30 (1979)
171. RAISON, J. K., LYONS, J. M., MEHLHORN, R. J.,
KEITH, A. D.:
Temperature-induced phase changes in mitochondrial
membranes detected by spin labeling.
J. BIOL. CHEM. 246, 4036-4040 (1971)
172. RANNEBERG, H., ARNOLD, C. G.:
Die Wirkung von Äthylmethansulfonat auf *Chlamydomonas
reinhardtii*.
MOL. GEN. GENET. 101, 212-216 (1968)
173. REBSTOCK, M. C., CROOKS, H. M., CONTROULIS, J.,
BART, Q. R.:
Chloramphenicol (Chloromycetin). IV. Chemical studies.
J. AMER. CHEM. SOC. 71, 2458-2462 (1949)
174. ROHR, R.:
Existence d'un réticulum mitochondrial dans les
cellules d'une culture de tissu haploïde d'une plante
vasculaire.
BIOL. CELL. 33, 89-92 (1978)
175. ROHR, R.:
Reconstruction tridimensionnelle du chondriome de

- Ginkgo en culture tissulaire; étude au moyen de coupes épaisses et de coupes fines sériées.
CAN. J. BOT. 57, 332-340 (1979)
176. ROSEN, D., EDELMAN, M., GALUN, E., DANON, D.:
Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*:
structural changes in mitochondria and other spore
constituents during conidium maturation and
germination.
J. GEN. MICROBIOL. 83, 31-49 (1974)
177. ROSSI, G. R., COCUCCI, M.:
Effects of total anaerobiosis on the mitochondrial
system of *Rhodotorula gracilis*.
CELL DIFFERENTIATION 7, 223-233 (1978)
178. RYAN, R. S., GRANT, D., CHIANG, K. S., SWIFT, H.:
Isolation of mitochondria and characterization of
the mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*.
J. CELL BIOL. 59, 297a (1973)
179. RYAN, R. S., GRANT, D., CHIANG, K. S., SWIFT, H.:
Isolation and characterization of mitochondrial DNA
from *Chlamydomonas reinhardtii*.
PROC. NAT. ACAD. SCI. U. S. BIOL. SCI. 75,
3268-3272 (1978)
180. SAGAN, L.:
On the origin of mitosing cells.
J. THEOR. BIOL. 14, 225-274 (1967)
181. SAGER, R., GRANICK, S.:
Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*.
ANN. N. Y. ACAD. SCI. 56, 831-838 (1953)

182. SAGER, R., GRANICK, S.:
Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardi*.
J. GEN. PHYSIOL. 37, 729-742 (1954)
183. SAHLI, M., ZIEGLER, H., OESCH, M.:
Nachweis von Hydrolyseprodukten des Chloramphenicols
mittels Dünnschichtchromatographie.
PHARM. ZTG. 44, 1542-1544 (1965)
184. SCHIMMER, O., ARNOLD, C. G.:
Untersuchungen über Reversions- und Segregationsverhalten eines außerkaryotischen Gens von *Chlamydomonas reinhardii* zur Bestimmung des Erbträgers.
MOL. GEN. GENET. 107, 281-290 (1970)
185. SCHLÖSSER, U.:
Enzymatisch gesteuerte Freisetzung von Zoosporen bei *Chlamydomonas reinhardii* DANGEARD in Synchronkultur.
ARCH. MIKROBIOL. 54, 129-159 (1966)
186. SCHLÖSSER, U. G.:
Entwicklungs- und sippenspezifische Zellwand-Autolyse bei der Freisetzung von Fortpflanzungszellen in der Gattung *Chlamydomonas*.
BER. DEUT. BOT. GES. 89, 1-56 (1976)
187. SCHÖTZ, F.:
Dreidimensionale, maßstabsgetreue Rekonstruktion einer grünen Flagellatenzelle nach Elektronenmikroskopie von Serienschnitten.
PLANTA 102, 152-159 (1972)
188. SCHÖTZ, F., BATHELT, H., ARNOLD, C. G., SCHIMMER, O.:
Die Architektur und Organisation der *Chlamydomonas*-

Zelle. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von Serienschritten und der daraus resultierenden dreidimensionalen Rekonstruktion.

PROTOPLASMA 75, 229-254 (1972)

189. SCHOR, S., SIEKEVITZ, P., PALADE, G. E.:
Cyclic changes in thylakoid membranes of synchronized *Chlamydomonas reinhardtii*.
PROC. NAT. ACAD. SCI. U. S. BIOL. SCI. 66, 174-180 (1970)
190. SENGER, H., PFAU, J., WERTHMÜLLER, K.:
Continuous cultivation of homocontinuous and synchronized microalgae.
In: Methods in Cell Physiology, Vol. V, pp. 301-323.
PRESCOTT, D. N., ed.
New York: ACADEMIC PRESS 1972
191. SENGER, H., WOLF, H. J.:
Eine automatische Verdünnungsanlage und ihre Anwendung zur Erzielung homokontinuierlicher Kulturen.
ARCH. MIKROBIOL. 48, 81-94 (1964)
192. SICKO-GOAD, L., STOERMER, E. F.:
A morphometric study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyta)
J. PHYCOL. 15, 316-321 (1979)
193. SILVERBERG, B. A.:
An ultrastructural and cytochemical characterization of microbodies in the green algae.
PROTOPLASMA 83, 269-295 (1975)
194. SILVERBERG, B. A., SAWA, T.:
Cytochemical localization of oxidase activities with diaminobenzidine in the green alga *Chlamydomonas*

dysosmos.

PROTOPLASMA 81, 177-188 (1974)

195. SMITH, D. G., MARCHANT, R.:
Chloramphenicol inhibition of *Pythium ultimum* and
Rhodotorula glutinis.
ARCH. MIKROBIOL. 60, 262-274 (1968)
196. SMITH-JOHANNSEN, H., GIBBS, S. P.:
Effects of chloramphenicol on chloroplast and mito-
chondrial ultrastructure in *Ochromonas danica*.
J. CELL BIOL. 52, 598-614 (1972)
197. SMITH, U., SMITH, D. S., YUNIS, A. A.:
Chloramphenicol-related changes in mitochondrial
ultrastructure.
J. CELL SCI. 7, 501-521 (1970)
198. SOHAL, R. S., BRIDGES, R. G.:
Associated changes in the size and number of mito-
chondria present in the midgut of the larvae of the
housefly, *Musca domestica* and phospholipid composi-
tion of the larvae.
J. CELL SCI. 34, 65-79 (1978)
199. SOSLAU, G., NASS, M. M. K.:
Effects of ethidium bromide on the cytochrome content
and ultrastructure of L cell mitochondria.
J. CELL BIOL. 51, 514-524 (1971)
200. SPURR, A. R.:
A low-viscosity epoxy resin embedding medium for
electron microscopy.
J. ULTRASTRUCT. RES. 26, 31-43 (1969)

201. STEVENS, B. J.:
Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstruction.
BIOL. CELL. 28, 37-56 (1977)
202. STEVENS, B. J., WHITE, J. G.:
Computer reconstruction of mitochondria from yeast.
In: Methods in Enzymology, Vol. LVI, pp. 718-728.
SAN PIEDRO, A., ed.
New York: ACADEMIC PRESS 1979
203. STOCKEM, W.:
Die Eignung von PIOLOFORM-F für die Herstellung elektronenmikroskopischer Trägerfilme.
MIKROSKOPIE 26, 185-189 (1970)
204. STRALEY, S. C., BRUCE, V. G.:
Stickiness to glass. Circadian changes in the cell surface of Chlamydomonas reinhardi.
PLANT PHYSIOL. 63, 1175-1181 (1979)
205. SUEOKA, N.:
Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in Chlamydomonas reinhardi.
PROC. NAT. ACAD. SCI. U. S. BIOL. SCI. 46, 83-91 (1960)
206. SUHRLAND, L. G., WEISBERGER, A. S.:
Chloramphenicol toxicity in liver and renal disease.
ARCH. INTERN. MED. 112, 747-754 (1963)
207. SURZYCKI, S. J., GILLHAM, N. W.:
Organelle mutations and their expression in Chlamy-

- domonas reinhardi.
PROC. NAT. ACAD. SCI. U. S. BIOL. SCI. 68,
1301-1306 (1971)
208. SURZYCKI, S. J., GOODENOUGH, U. W., LEVINE, R. P.,
ARMSTRONG, J. J.:
Nuclear and chloroplast control of chloroplast
structure and function in Chlamydomonas reinhardi.
SYMP. SOC. EXP. BIOL. 24, 13-37 (1970)
209. SUZUKI, K.:
Giant mitochondria: production in mice fed with
cuprizone.
SCIENCE 163, 81 (1969)
210. TANDLER, B., ERLANDSON, R. A., SMITH, A. L.,
WYNDER, E. L.:
Riboflavin and mouse hepatic cell structure and
function. II. Division of mitochondria during
recovery from simple deficiency.
J. CELL BIOL. 41, 477-493 (1969)
211. TANDLER, B., HOPPEL, C. L.:
Division of giant mitochondria during recovery from
cuprizone intoxication.
J. CELL BIOL. 56, 266-272 (1973)
212. TAYLOR, J. W., WELLS, K.:
The mitochondrion in mitotic and starved cells of
Bullera alba.
EXP. MYCOL. 3, 16-27 (1979)
213. THOENES, W.:
Über matrixreiche Riesenmitochondrien. Elektronen-

mikroskopische Beobachtungen am Tubulusepithel der menschlichen Niere bei nephrotischem Syndrom.

Z. ZELLFORSCH. 75, 422-433 (1966)

214. VÁZQUEZ, D.:

Inhibitors of protein synthesis.

Molecular Biology, Biochemistry, and Biophysics,
Vol. XXX.

KLEINZELLER, A., SPRINGER, G. F., WITTMAN, H. G.,
eds.

Berlin, Heidelberg, New York: SPRINGER 1979

215. VENABLE, J. H., COGGESHALL, R.:

A simplified lead citrate stain for use in electron
microscopy.

J. CELL BIOL. 25, 407-408 (1965)

216. WAGNER, T., RAFAEL, J.:

ATPase complex and oxidative phosphorylation in
chloramphenicol-induced megamitochondria from mouse
liver.

BICHIM. BIOPHYS. ACTA 408, 284-296 (1975)

217. WAKABAYASHI, T., ASANO, M., ISHIKAWA, K.,

KISHIMOTO, H.:

Mechanism of the formation of megamitochondria by
copper-chelating agents. V. Further studies on iso-
lated megamitochondria.

ACTA PATHOL. JPN. 28, 215-223 (1978)

218. WALNE, P. L.:

The effects of colchicine on cellular organization
in Chlamydomonas. II. Ultrastructure.

AMER. J. BOT. 54, 564-576 (1967)

219. WARA-ASWAPATI, O., BRADBEER, J. W.:
Chloramphenicol as an energy transfer inhibitor in
spinach chloroplasts.
PLANT PHYSIOL. 53, 691-693 (1974)
220. WATSON, A. D. J.:
Further observations on chloramphenicol toxicosis
in cats.
AMER. J. VET. RES. 41, 293-294 (1980)
221. WATSON, A. D. J., MIDDLETON, D. J.:
Chloramphenicol toxicosis in cats.
AMER. J. VET. RES. 39, 1199-1203 (1978)
222. WEISBLUM, B., DAVIES, J.:
Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome.
BACTERIOL. REV. 32, 493-528 (1968)
223. WORTH, E. R., LUCAS, F. V.:
3-dimensional study of endometrial mitochondria
during menstrual cycle.
AMER. J. OBSTET. GYNECOL. 130, 152-155 (1978)
224. YANG, G. C. H., SHEA, S. M.:
The precise measurement of the thickness of ultra-
thin sections by a "re-sectioned section" technique.
J. MICROSC. 103, 385-392 (1975)
225. YOTSUYANAGI, Y.:
Mitochondria and refractive granules in the yeast
cell.
NATURE 176, 1208-1209 (1955)

226. YUNIS, A. A., BLOOMBERG, G. R.:
Chloramphenicol toxicity: clinical features and
pathogenesis.
PROGR. HEMATOL. 4, 138-159 (1964)
227. ZETTEL, H. B., ARNOLD, C. G.:
Die Wirkung von Gentamycin und Lincomycin auf die
Ultrastruktur der Mitochondrien und Plastiden von
Chlamydomonas reinhardtii.
ARZNEIM.-FORSCH./DRUG RES. 27, 1117-1122 (1977)
228. ZOLLINGER, H. U.:
Cytologic studies with the phase microscope. II.
The mitochondria and other cytoplasmic constituents
under various experimental conditions.
AMER. J. PATHOL. 24, 569-589 (1948)

Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. C. G. Arnold für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und zahlreichen wertvollen Anregungen, Herrn Dr. K. P. Gaffal für hilfreiche Ratschläge zur Serienschnittechnik und dreidimensionalen Rekonstruktion, seine Unterstützung bei elektronenmikroskopischen Fragestellungen und für die Durchsicht des Manuskripts, Frau G. Schneider für ihre Hilfe in der Elektronenmikroskopie und Dunkelkammertechnik sowie für die Unterstützung bei vielen kleinen Problemen, die während der Anfertigung dieser Arbeit zu lösen waren, nicht zuletzt aber der ganzen Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

LEBENS LAUF

Rudolf Johann B l a n k

07. März 1951	geboren in Amberg als erster Sohn des Polizeibeamten Georg Blank und seiner Ehefrau Angela, geb. Forster
Sep. 1957 - Juli 1961	Besuch der Luitpoldschule Amberg
Sep. 1961 - Juni 1970	Besuch des humanistischen Erasmus-Gymnasiums Amberg
20. Juni 1970	Reifeprüfung
Okt. 1970 - März 1971	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Erlangen-Nürnberg
Apr. 1971 - März 1977	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Erlangen-Nürnberg
24. Juli 1973	Zwischenprüfung in Chemie
22. Apr. 1974	Zwischenprüfung in Biologie
30. Aug. 1974	Verehelichung mit Hedwig Janocha
13. Dez. 1976	Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in Biologie und Chemie
21. Dez. 1976	Diplomprüfung in Biologie
Apr. 1977 - Sep. 1980	Promotionsstudium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg
Apr. 1977 - März 1980	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg
Okt. 1977 - Feb. 1980	Promotionsstipendiat der Friedrich-Naumann-Stiftung
seit Apr. 1980	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg

